

Untersuchungen zu der Rolle von
MORG1 und HIF-1 α in der Sepsis
induzierten Nierenschädigung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Claudia Schindler

geboren am 29.05.1977 **in** Hoyerswerda

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Gunter Wolf, MHBA, Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Habil Reinhard Wetzker, Jena
3. Prof. Dr. med. Kai-Uwe Eckhardt, Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	VI
Abstract	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Medizinische und gesellschaftliche Bedeutung der Sepsis	1
1.2 Pathogenese der Sepsis und der Sepsis induzierten Nierenschädigung	1
1.2.1 Pathogenese der Sepsis	1
1.2.2 Pathogenese der Sepsis induzierten Nierenschädigung	3
1.3 Nierenfunktion	7
1.4 Bedeutung von MORG1 und HIF-1 α in der Sepsis induzierten Nierenschädigung	9
1.4.1 Allgemeine und physiologische Bedeutung von MORG1 und HIF-1 α	9
1.4.2 Nierenspezifische und pathophysiologische Bedeutung von MORG1 und HIF-1 α	13
2 Ziele der Arbeit	16
3 Methoden	17
3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	17
3.2 Tierexperimentelles Protokoll	17
3.2.1 Versuchsgruppen	17
3.2.2 Narkose	19
3.2.3 Behandlungen	19
3.2.4 Entnahme und Vorbereitung von Vollblut, Niere und Urin	23
3.3 Histologische Methoden	24
3.3.1 Charakterisierung von morphologischen Veränderungen der Niere nach Sepsis-Induktion durch die PAS-Reaktion	24
3.3.2 Analyse von apoptotischen Gewebeschäden der Niere via TUNEL und aktiver Caspase 3	25
3.3.3 Immunhistologischer Nachweis von Proteinen im Nierengewebe	26
3.4 Molekularbiologische Analyse	28
3.4.1 Isolation der RNS und reverse Transkription	28
3.4.2 Real time PCR	28
3.4.3 Untersuchung der Expression von Proteinen mit ELISA	30
3.4.4 Detektion von Zytokinen durch CBA	31
3.4.5 Analyse zur Nierenfunktion durch den kolorimetrischen Assay im Blutplasma und im Urin	31
3.5 Statistik	32
4 Ergebnisse	34
4.1 CSS Analyse in <i>Morg1</i> ^{+/-} – im Vergleich zu Wildtypmäusen	34

4.2	Analyse von MORG1 und HIF-1 α sowie involvierte Proteine wie HIF-2 α , PHD3, EPO, GLUT1 und VEGF nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Gabe	36
4.2.1	Expression von MORG1	36
4.2.2	Expression von HIF-1 α	40
4.2.3	Expression von HIF-2 α	44
4.2.4	Expression von PHD3	48
4.2.5	Analyse von HIF-Zielgenen	52
4.3	Charakterisierung des Einflusses von MORG1 und HIF-1 α auf mögliche nekrotische Veränderungen des Nierengewebes nach einer Sepsis-Induktion bzw. LPS-Gabe	56
4.4	Beurteilung der Rolle von MORG1 und HIF-1 α auf mögliche Sepsis bzw. LPS induzierte apoptotische Veränderungen im Nierengewebe	59
4.5	Einfluss von MORG1 und HIF-1 α auf die Inflammation und Infiltration im Nierengewebe nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Gabe	63
4.5.1	Analyse der inflammatorischen Zytokine	63
4.5.2	Analyse der T-Zell-Infiltration	69
4.6	Bewertung der Nierenfunktion mithilfe der Parameter Kreatinin, BUN, NGAL und ACR	71
4.6.1	Analyse von Kreatinin im Blutplasma	71
4.6.2	Analyse von BUN im Blutplasma	72
4.6.3	Analyse von NGAL im Blutplasma	73
4.6.4	Analyse von ACR im Urin	74
4.7	Einfluss von MORG1 und HIF-1 α auf das Überleben bei den drei Behandlungsmodellen CLP, PCI und LPS	76
5	Diskussion	78
6	Schlussfolgerung und Aussicht	91
	Abbildungsverzeichnis	X
	Tabellenverzeichnis	XII
	Literatur- und Quellenverzeichnis	
	Anhang	
	Lebenslauf	
	Danksagung	
	Ehrenwörtliche Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

ACR	Albumin/Kreatinin-Ratio
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ANV	akutes Nierenversagen
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> , HIF-1 β
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
BUN	Blut-Harnstoff-Stickstoff
CAD	C-terminale Transkription-Aktivierungsdomäne
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase 3	<i>cysteinyI-aspartate specific protease 3</i>
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CBP	<i>cAMP response element-binding protein</i>
cDNS	komplementäre DNS
CD14	<i>cluster of determination 14</i>
CD3 ⁺	<i>cluster of determination 3⁺</i>
CLP	ceacale Ligation und Punktion
cm	Zentimeter
c-Myc	c-Myelocytomatose Onkogen
CSS	<i>clinical severity score</i>
C _T	Echtzeit-Daten durch <i>cycle of threshold value</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Digoxigenin gekoppeltes Uridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	Erythropoetin (Protein)
<i>Epo</i>	Erythropoetin (Gen/mRNS)
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>foetal calf serum</i>
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisenkation
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i> , ARD1
g	Gramm
GLUT1	Glukosetransporter 1 (Protein)
<i>Glut1</i>	Glukosetransporter 1 (Gen/mRNS)
h	Stunde
Hg	Quecksilber
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i> (Protein)
<i>Hif</i>	<i>hypoxia inducible factor</i> (Gen/mRNS)
<i>Hprt</i>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (mRNS)
HRE	<i>hypoxia response element</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
INF γ	Interferon <i>gamma</i>
IgG	Immunglobulin G

IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
i. p.	<i>intra peritoneal</i>
ITS	Intensivtherapiestation
KbE	Koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LBP	LPS bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minute
MORG1	MAPK <i>organizer</i> 1 (Protein)
<i>Morg1</i>	MAPK <i>organizer</i> 1 (Allel/Gen/mRNS)
MOV	Multiorganversagen
MP1	MAPK <i>kinase</i> 1– <i>interacting protein</i> 1
mRNS	<i>messenger</i> RNS
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> (Onkogen)
MW	Mittelwert
NAD	N–terminale Transkription–Aktivierungsdomäne
NGAL	<i>neutrophil gelatinase–associated lipocalin</i>
NF–κB	<i>nuclear factor–kappa B</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
2–OG	2–Oxoglutarat
ODD	<i>oxygen dependent degradation</i>
OP	Operation
O ₂	Sauerstoff
p	Signifikanzniveau
PAMP	<i>pathogen–associated molecular pattern</i>
PAS	<i>periodic acid</i> Schiff (histologisches Verfahren)
PAS	PER–ARNT–SIM, konservierte Region im HIF–Protein
PCI	peritoneale Kontamination und Infektion
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PHD	Prolylhydroxylase (Protein)
<i>Phd</i>	Prolylhydroxylase (Gen/mRNS)
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck in mmHG
POD	Peroxidase
Pol II	Polymerase II
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
p53	Tumorsuppressor p53
p300	Histone–Acetyltransferase–Domäne von EP300

Rb	Kaninchen
Rbx1	<i>ring-box protein 1</i>
Ref-1	<i>redox effector factor-1</i>
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunde
s. c.	<i>sub cutan</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Siah1/2	<i>seven in absentia homolog 1/2</i>
siRNS	<i>small interfering RNS</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SRC-1	<i>steroid receptor coactivator-1</i>
SUMOs	<i>small ubiquitin-like modifiers</i>
T _{ann}	Temperatur der Primerhybridisierung
TdT	terminale Desoxinukleotidyltransferase
TIF2	<i>transcriptional mediators/intermediary factor 2</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i> (Protein)
<i>Tnfa</i>	<i>tumor necrosis factor α</i> (Gen/mRNA)
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (Protein)
pVHL	von-Hippel-Lindau-Komplex
Vit C	Ascorbinsäure
Δ	Differenz
δ	Gradient
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
° C	Grad Celsius
%	Prozent
*	Signifikanz sham-CLP/NaCl behandelte <i>versus</i> CLP/PCI/LPS
#	Signifikanz Wildtyp <i>versus</i> <i>Morg1^{+/-}</i>
♀	Frauen
♂	Männer
+/+	Wildtyp
+/-	Heterozygot
>	größer als
<	kleiner als
18S	ribosomale RNS
21G	Kanüle mit einem Außendurchmesser von 0,8 mm

Zusammenfassung

Die Sepsis ist eine generalisierte, hyperinflammatorische Wirtsantwort, die durch eine Infektion verursacht wird. Ein akutes Nierenversagen ist häufig mit einer Sepsis assoziiert aufgrund der überschüssenden Immunantwort des Wirts und der eingeschränkten Gewebeversorgung der Niere mit Sauerstoff. *Hypoxia inducible factor-1* sowie *2 alpha* (HIF-1/2 α) sind essentiell für die zelluläre Adaptation an hypoxische Zustände im Gewebe. Unter Normoxie erfolgt die Regulation von HIF-1 α durch Prolylhydroxylasen (PHDs), die die proteasomale Degradation der HIF-1 α und HIF-2 α Proteine über den Ubiquitin-E3-Ligasekomplex induzieren. Das Gerüstprotein *mitogen-activated protein kinase organizer 1* (MORG1) interagiert mit PHD3, einer von drei PHD-Isoformen, und beeinflusst die Regulation und die Stabilität von HIF-1/2 α . In verschiedenen Tiermodellen wie die renale Ischämie/Reperfusion wurde teilweise eine nierenprotektive Wirkung in Mäusen gezeigt, die nur ein *Morg1*-Allel exprimierten (heterozygote *Morg1*-Mäuse, *Morg1*^{+/-}-Mäuse). Diese Tiere zeigten weniger renale Apoptose und tubuläre Schädigung, assoziiert mit einer erhöhten Expression von HIF-1/2 α -Protein. Demgegenüber zeigten frühere Untersuchungen im Sepsis-Modell der caecalen Ligation und Punktion (CLP), dass eine Deletion von HIF-1 α eine Reduktion der Inflammation bewirkt. Die Rolle von MORG1 in der Sepsis induzierten Nierenschädigung wurde bisher nicht untersucht. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss der sepsisabhängigen Nierenschädigung in *Morg1*^{+/-}- und Wildtypmäusen analysiert. Eine Peritonitis wurde in zwei Sepsis-Mausmodellen – caecale Ligation und Punktion und peritoneale Kontamination und Infektion (PCI) – induziert. Als weiteres Modell wurde eine hyperinflammatorische Situation durch Lipopolysaccharinde (LPS)-Applikation verursacht. Um die Wirkung des MORG1-PHD3-HIF-Komplexes in der Sepsis assoziierten Nierenschädigung zu erforschen, wurden die renale Morphologie und Funktion sowie inflammatorische Marker analysiert. Zusätzlich wurden Überlebensstudien an den drei Mausmodelle durchgeführt. Die immunhistologische Analyse der in Paraffin eingebetteten Nierenschnitte zeigte keine signifikante Erhöhung der

MORG1-Expression nach Sepsis-Induktion in den Wildtypmäusen, wohingegen im LPS-Modell MORG1 leicht erhöht exprimiert war. In den *Morg1^{+/-}*-Mäusen waren die MORG1-Level im CLP-Sepsis-Modell signifikant reduziert. Das HIF-1/2 α -Protein akkumulierte im Nierengewebe nach Sepsis-Induktion in beiden Maus-Genotypen, doch der höchste Protein-Level wurde in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen nach Sepsis-Induktion durch CLP detektiert. Von den analysierten HIF-Zielgenen war der vaskuläre Wachstumsfaktor VEGF im Blutplasma erhöht nachweisbar. Die Reduktion von MORG1 oder/und die Stabilisierung von HIF-1/2 α -Protein zeigten renoprotektive Effekte in der Niere der *Morg1^{+/-}*-Mäuse verglichen mit den septischen Wildtypmäusen. Dies wurde in der geringeren Vakuolisierung und tubulärer Apoptose sowie Nekrose 24h nach Induktion von Sepsis oder LPS-Applikation deutlich. In Übereinstimmung mit diesen Befunden, wurde in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen eine Protektion gegen die Infiltration von CD3⁺-T-Zellen in beiden Sepsis-Modellen und dem Endotoxämie-Modell im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypmäusen gefunden. Diese Daten reflektieren aber nicht die systemische Inflammation, da keine signifikanten Unterschiede in den inflammatorischen Zytokinen im Blutplasma unter diesen experimentellen Bedingungen gefunden wurden. Zudem war die Nierenfunktion verschlechtert aufgrund der Sepsis- und Endotoxämie-Induktion in beiden Maus-Genotypen mit ähnlichem Ausmaß. Weiterhin wurde der Effekt der Reduktion von MORG1 und HIF-1/2 α -Aktivierung auf die Überlebensrate über 72 Stunden analysiert. Die Daten zeigten, dass die Suppression der MORG1-Expression mit einer gesteigerten Letalität der septischen Tiere korrelierte verglichen mit den entsprechenden Wildtypmäusen.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von MORG1 bzw. die HIF-1/2 α -Aktivierung keinen Vorteil für das Überleben unter septischen Konditionen hat, wenn auch trotz signifikanter renoprotektive Effekte. Die LPS-Injektion beeinflusste nicht die Überlebensrate der Tiere weder in den *Morg1^{+/-}*- noch in den Wildtypmäusen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese scheinbar widersprüchlichen Befunde aufzuklären und um den Einfluss von MORG1 und HIF-1/2 α in der Sepsis induzierten Schädigung anderer Organe zu prüfen.

Abstract

Sepsis is a generalized hyperinflammatory host response caused by an infection. Renal dysfunction such as acute renal failure is frequently associated with sepsis due to the limited supply of tissue oxygen in the renal tissue, and the extremely strong host immune response. Hypoxia inducible factor-1 as well as 2 α (HIF-1/2 α) are essential for cellular adaptation to hypoxic conditions in the tissue. Under normoxia, the regulation of HIF-1 α occurs by prolylhydroxylases (PHDs) that induce the proteasomal degradation of HIF-1 α and HIF-2 α via the ubiquitin-E3-ligase-complex. The scaffold protein mitogen-activated protein kinase organizer 1 (MORG1) interacts with PHD3, one of three known PHD isoforms, and provides the regulation and stabilization of the HIF-1/2 α proteins. In various animal models such as renal ischemia/reperfusion exhibited partially kidney protective effect in mice expressing only one *Morg1* allele (heterozygous *Morg1* mice, *Morg1*^{+/-} mice). These animals showed less renal apoptosis and tubular damage, which was associated with increased HIF-1/2 α protein's expression. On the other hand previous studies have demonstrated that deletion of HIF-1 α in a sepsis model of cecal ligation and puncture (CLP) leads to a reduced inflammation.

The role of MORG1 in relation to enhanced HIF-1 α protein levels in sepsis-induced renal injury has not yet been investigated. Therefore, in this study we have analysed the influence of sepsis dependent kidney damage in *Morg1*^{+/-} and wild-type mice. Peritonitis was induced in two sepsis mouse models – CLP and peritoneal contamination and infection (PCI), in addition endotoxemia was studied in lipopolysaccharides (LPS) treated mice. To figure out the impact of MORG1-PHD3-HIF complex in sepsis-induced renal injury the kidney morphology and function as well as the inflammatory markers were explored in more detail. Furthermore, the survival studies using the above three mouse models were performed.

Immunohistological analysis of kidney slices demonstrated that sepsis induction did not significantly affect the MORG1 protein expression in wild-type animals, whereas it was slightly elevated by LPS application. However, in

Morg1^{+/-} mice MORG1 levels were significantly reduced in CLP–sepsis model. The HIF–1/2 α was accumulated in renal tissue after sepsis induction in both genotypes, but the highest protein levels were detected in the *Morg1*^{+/-} mice after CLP–sepsis induction. Nevertheless, the HIFs target gene vascular growth factor VEGF was increased expressed in blood plasma. The reduction of MORG1 or/and stabilization of HIF–1/2 α protein showed renoprotective effects in kidney of *Morg1*^{+/-} animals, demonstrated as less vacuolization and tubular apoptosis and necrosis 24 hours after induction of sepsis or LPS application compared with the wild–type septic mice. In agreement with these observations, the *Morg1*^{+/-} mice were protected against the infiltration of CD3⁺–T–cells in both sepsis models and endotoxemia as compared to the corresponding wild–type animals. However, that did not reflect the systemic inflammation, as we did not detect significant differences in the inflammatory cytokine concentrations in the blood plasma under our experimental conditions. Furthermore, renal function was deteriorated due to sepsis and endotoxemia induction in both mouse genotypes to the similar extend.

Furthermore, the effect of MORG1 down–regulation and HIF–1 α activation were analysed by survival assay over 72 hours. Our data have shown that suppression of MORG1 expression was correlated with an increased lethality of septic animals compared with the correspondingly treated wild–type mice.

Therefore, we can conclude that Inhibition of MORG1 or HIF–1/2 α activation is not beneficial for animal survival under sepsis conditions, regardless of their renoprotective effects. On the other hand, the LPS injection did not affect the survival ability of the animals either *Morg1*^{+/-} or wild–type mice. Further analyses are needed to elucidate these seemingly contradictory findings. The influence of MORG1 and HIF–1/2 α in other organs injury by sepsis should be also addressed.

1 Einleitung

1.1 *Medizinische und gesellschaftliche Bedeutung der Sepsis*

Die Sepsis¹ ist eine durch Mikroorganismen verursachte Infektion mit einer generalisierten, inflammatorischen Wirtsantwort. Formuliert und beobachtet wurde diese Dysreaktion in seiner Komplexität um 1900 unter anderem von Paul Ehrlich (zitiert von Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.) und 1914 von Hugo Schottmüller [zitiert in (Budelmann 1969)]. Um die Findung einer Definition dieses Erkrankungsbilds machten sich 1989 Bone und Balk verdient (Bone und Bone 1989). Aufgrund der öffentlichen und fachlichen Unwissenheit und um die prägnante Gefahr der Sepsis als lebensbedrohliche klinische Krankheitserscheinung mit pathophysiologischen Veränderungen zu zeigen (Ibrahim 2008, Rubulotta et al. 2009), wurden weitere Modifikationen vorgenommen (Bone et al. 1992, Brunkhorst et al. 2010).

In Deutschland hat die Sepsis eine Prävalenz von 34,7%. Die drei Monats Mortalität liegt über 54% für eine schwere Sepsis (Brunkhorst et al. 2005b, Bauer et al. 2006, Brunkhorst et al. 2005a, Engel et al. 2007). Die hohe Letalität von 60.000 Fällen pro Jahr in Deutschland heben die septischen Infektionen auf die dritthäufigste, bekannte Todesursache nach den koronaren und akuten Herzerkrankungen (Bauer et al. 2006, Engel et al. 2007). Die septischen Erkrankungen sind mit 220 Neuinfektionen pro Jahr vergleichbar mit denen der Komplikation Herzinfarkt (Angus et al. 2001, Hall et al. 2011). Die Überlebenden einer Sepsiserkrankung haben oft Folgeschäden durch Sepsis induzierte Veränderungen in vielen Organsystemen (Gonnert et al. 2011).

1.2 *Pathogenese der Sepsis und der Sepsis induzierten Nierenschädigung*

1.2.1 Pathogenese der Sepsis

An der Pathogenese einer Sepsiserkrankung sind die Virulenz oder Pathogenität des Erregers, die Menge des Inokulums, die schon bestehenden Komorbiditäten, das Alter sowie genetische Polymorphismen und der inflammatorische

¹ In dieser Arbeit wird dieses Erkrankungsbild allgemein als Sepsis bezeichnet.

Insult des Wirtsorganismus maßgeblich beteiligt (Hotchkiss und Karl 2003). Die **Abbildung 1** zeigt schematisch die einzelnen Schweregrade der Sepsiserkrankung (Bone et al. 1992) einschließlich der Risikogruppe, der Symptome, den Verlauf und die Folge der Erkrankung.

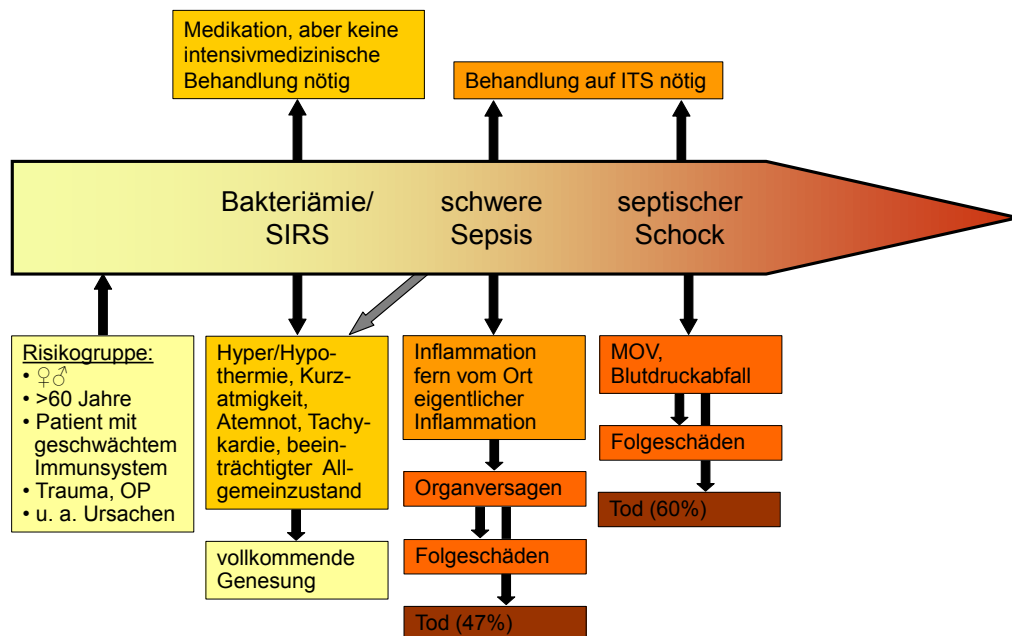


Abbildung 1: Schweregrade der Sepsis. Schematische Darstellung der Sepsiserkrankung einschließlich der Risikogruppen, Symptome und Folgen. SIRS, *systemic inflammatory response syndrom*. OP, Operation. ITS, Intensivtherapiestation. MOV, Multiorganversagen. Illustration nach (Rangel-Frausto et al. 1995, Gullo et al. 2005, Buras et al. 2005, Reinhart und Brunkhorst 2010).

Verschiedene Pathogene (Wichterman et al. 1980, Janeway und Medzhitov 1998, Blanco et al. 2008) und ihre Produkte (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) (Reinhart et al. 2004a, Bianchi 2007) lösen dabei eine Sepsis aus. Aber auch deren gegebene Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) sowie Bindungsmoleküle (Reinhart et al. 2004b) und endogene Moleküle (*alarmins*) können Auslöser einer systemischen Wirtsantwort sein (Janeway und Medzhitov 2002). Diese exo- bzw. endogenen Stoffe führen zu Schäden in infektionsortfernen Geweben bzw. Organen und können bis zu einem Multiorganversagen (MOV) führen (Bochud und Calandra 2003). Die verantwortenden exogenen Pathogene sind Mikroorganismen (Mono- oder Multikulturen) überwiegend der Familie *Enterobacteriaceae*, aber auch Pilze

(Parrillo 1993), Viren und Parasiten (Bernard et al. 2001). Dennoch werden nur bei 30-50% der Sepsis-Fälle der Kontakt mit einem Erreger nachgewiesen (Riedemann et al. 2003). Die Mikroorganismen besiedeln äußere und innere Oberflächen des Menschen. Das angeborene Abwehrsystem (physiologische Barrierefunktion, Komplement, antimikrobielle Peptide, Phagozyten, zelluläre und humorale Komponenten) reguliert diese Symbiose (Zinkernagel et al. 2007). Wenn diese Balance unterbrochen wird, kann eine Infektion entstehen, die erst verstärkt und dann dysreguliert vorliegt (Osmon et al. 2003). Dabei werden entzündungsfördernde, proinflammatorische Mediatoren (Zytokine) wie *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) und Interleukine (IL) wie IL-6 (Abbas et al. 1996, Opal und DePalo 2000), aber auch Chemokine, Lipidmediatoren, Sauerstoffradikale sowie immunkompetente Zellen wie Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten ausgeschüttet (Berg et al. 2011). Durch Vorgänge in der proinflammatorischen Immunantwort entstehen Schäden am Endothel, die dann wiederum Auslöser (*alarmins*) sind für eine erneute Immunantwort. Entsprechend fördern antiinflammatorische Zytokine und der programmierte Zelltod (Apoptose) den Abbruch der Immunreaktion, um die Infektion zu begrenzen und Reparaturprozesse zu initiieren (Voll et al. 1997). Bei der Entstehung eines septischen Erkrankungsbilds löst die primäre Immunantwort die Freisetzung weiterer, sekundärer Mediatoren aus und resultiert in einer verstärkten autark und progressiv verlaufenden Immunantwort oft von lebensbedrohlichem Ausmaß (Fink und Evans 2002). Die Pathogenese des Sepsis induzierten Organversagens ist multifaktoriell und noch nicht vollständig verstanden. Vermutlich zählen neben der bakteriellen Inflammation die Gewebhypoperfusion und -hypoxie zu den Hauptfaktoren (Cohen 2002). Charakteristisch für ein entzündetes Gewebe sind Sauerstoffmangel (Ischämie, Hypoxie) und/oder insuffiziente Zirkulation des Bluts sowie eine geringe Konzentration an Glukose (Adams et al. 2009, Wilson 2009).

1.2.2 Pathogenese der Sepsis induzierten Nierenschädigung

Die Niere ist Ziel einer Sepsis assoziierten Organdysfunktion (Fischer und Polk 1975, Russell et al. 2000), die mit der Entstehung eines akuten Nierenversagens (ANV) einhergeht (Rangel-Frausto et al. 1995, Wang et al.

1999, Lopes et al. 2007, Bonventre 2007, Bellomo et al. 2008). Ein ANV liegt in annähernd der Hälfte der septischen Patienten in deutschen Krankenhäusern (Uchino et al. 2005) vor. Ähnliche Inzidenzen sind aus anderen Ländern bekannt (Neveu et al. 1996, Bagshaw et al. 2007). Die Sepsis geht oft mit verminderter Harnausscheidung, Oligurie und Azotämie (erhöhter Gehalt an harnpflichtigen Substanzen im Blut) einher (Harris et al. 1987). Bei einem ANV treten ebenfalls eine veränderte Urinausscheidung und/oder glomeruläre Filtration (Mehta et al. 2007) sowie Nekrose der Tubuli auf (Chertow et al. 2005, Gunaratnam und Bonventre 2009). Etwa 67% der Patienten mit einem septischen ANV versterben (Neveu et al. 1996, Uchino et al. 2005, Bagshaw et al. 2007, Bagshaw et al. 2009), da ein akutes Nierenversagen den Verlauf einer Sepsis verschlechtert (Goodwin und Schaer 1989, Russell et al. 2000, Bauer et al. 2006, Bagshaw et al. 2008). Das Risiko einer tödlich verlaufenden Sepsis steigt zudem bei dialysepflichtigen Patienten (Uchino et al. 2005, Oppert et al. 2008). Die Wichtigkeit der Prävention vor dem akuten Nierenversagen wird durch die Tatsache betont, dass sich die Mortalität des ANV trotz großer Fortschritte in der intensivmedizinischen Versorgung in den letzten 20 Jahren kaum vermindert hat (Klenzak und Himmelfarb 2005).

Sepsis *per se* wird nicht zwangsläufig für die Entstehung eines septischen ANV verantwortlich gemacht (Harris et al. 1987). Vielmehr führen hämodynamische und nicht hämodynamische Faktoren wie immunologische Faktoren zu Veränderungen in der Niere (Wan et al. 2008, Bellomo et al. 2008). Die Nieren reagieren empfindlich auf eine Minderperfusion oder Hypoxie (Brezis et al. 1984, Epstein et al. 1987), da diese unter physiologischen Konditionen einen relativen Sauerstoff (O_2)–Mangel im äußeren Mark aufweisen (Balaban und Sylvia 1981, Epstein et al. 1982). Eine Hypoxie ist definiert als Reduktion des Normallevels des Sauerstoffpartialdrucks (PaO_2) im Gewebe (Xia et al. 2009). In der Literatur werden verschiedene Ursachen für die Entstehung eines septischen ANV beschrieben. So wurde gezeigt, dass die Ischämie vermittelte, akute tubuläre Nekrose aufgrund einer Sepsis die häufigste Ursache des ANV ist (Liano und Pascual 1996, Mehta et al. 2004). Auch die Inflammation spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines Nierenversagens (Schrier et

al. 2004, Bonventre und Zuk 2004). In anderen Untersuchungen wurde allerdings gezeigt, dass das septische Nierenversagen mit beeinträchtigter renaler Mikrozirkulation (Wang et al. 2011, Seely et al. 2011) bzw. geringerer arterieller Blutversorgung sowie Vasokonstriktion und weniger mit akuter tubulärer Nekrose zusammenhängt (Harris et al. 1987, Terra et al. 2005). In weiteren Arbeiten wurden zudem die direkte toxische Schädigung durch Bakterien und Endotoxine, Ablagerungen von Mikrothromben in dem Nierengefäßsystem oder die Produktion freier Sauerstoffradikale als Verursacher eines Nierenschadens verantwortlich gemacht (Wang et al. 2003, Bonventre und Zuk 2004).

In der Niere sind Sauerstoffbereitstellung und –verbrauch different. Vom Cortex der Niere bis in die Medulla sinkt der gemessene PaO_2 (Welford et al. 2010). Eine medulläre Sauerstoffsuffizienz erfordert eine Regulation der intrarenalen Mikrozirkulation und der tubulären Transportaktivität (Rosenberger et al. 2006). Während der Nephrogenese treten physiologisch hypoxische Verhältnisse auf (Bernhardt et al. 2006a). In gesunden Geweben liegt der PaO_2 bei 17,5-63 mmHg (ca. 2,5-9% O_2), in Wunden und entzündlichen Geweben jedoch sinkt dieser auf ein viel geringeren Level von $<1\%$ O_2 (Zinkernagel et al. 2007). Der Hypoxie induzierte Faktor HIF-1/2 (*hypoxia inducible factor-1/2*) reguliert biologische Prozesse wie das Überleben, die anaerobe Glykolyse, die Zellproliferation oder die Apoptose und ist ein zentraler Regulator der Zelladaptation bei Hypoxie (Semenza 2001, Haase 2006, Rosenberger et al. 2006). Bei einer systemischen Hypoxie vermitteln die Nieren die Erythropoese durch rapide Erythropoetin (EPO)–Bereitstellung in den renalen interstitiellen Fibroblasten (Fandrey 2004). Aus Untersuchungen in verschiedenen Modellen der Nierenerkrankung wie Ischämie/Reperfusion oder Cisplatin–Nephropathie ist bekannt, dass die Aktivierung von HIF eine protektive Wirkung hat (Nangaku et al. 2008). Dafür reguliert HIF die Expression von verschiedenen Genen, die direkt relevant sind für die Adaptation an hypoxische Verhältnisse in der Niere während eines ANV (Maxwell 2003). So wird über die Leber zusätzlich EPO produziert, dessen Synthese von HIF-2 α reguliert wird (Rankin et al. 2007). In hypoxischen Nieren findet sich HIF-1 α in den Glomeruli sowie in den tubulären

Epithelzellen, wohingegen HIF-2 α in den EPO produzierenden interstitiellen Fibroblasten und peritubularen Endothelzellen exprimiert wird. Im Gegensatz zu Rosenberger et al. (Rosenberger et al. 2002) wurde in anderen Arbeiten HIF-2 α auch in den Tubuluszellen gefunden (Bondeva et al. 2013). Bei inadäquater Sauerstoffversorgung wechseln renale Tubuluszellen vom aeroben zum anaeroben Metabolismus, um die Glykolyse zur Hauptenergiegewinnung zu nutzen (Minchenko et al. 2003). Allerdings können die Tubuluszellen im S3-Segment, letztes Drittel der proximalen Tubuli, nicht zum anaeroben Metabolismus wechseln und haben zudem einen erhöhten Sauerstoffbedarf, sodass diese Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber hypoxischen Einflüssen aufweisen (Ruegg et al. 1987, Heyman et al. 2002). Unter längerer Hypoxie erschöpfen die ATP-Reserven der Tubuluszellen, sodass diese geschädigt werden können (Devarajan 2006). Das dabei zerstörte Zytoskelett führt dann zum Verlust des Bürstensaums der Tubuli und Zellverbindungen brechen auf, sodass der weiterführende Tubulusapparat beeinträchtigt wird. Die dadurch auftretende Ischämie fördert die tubuläre Ausschüttung von proinflammatorischen sowie chemotaktischen Zytokinen und resultiert in der Infiltration von Leukozyten in das Nierengewebe. Folglich blockieren die Leukozyten die Mikrozirkulation und sezernieren zytotoxische Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies und proteolytische Enzyme, die die Tubuluszellen weiter schädigen können (Bonventre und Zuk 2004). Diese Mechanismen und der programmierte Zelltod führen zu Zellverlust und zur Einschränkung der Gewebefunktion der Niere (Cobb et al. 2000, Paxian et al. 2003).

In der Literatur werden Modelle der Sepsis-Induktion und die Analyse in verschiedenen Tierarten beschrieben (Buras et al. 2005). Das Modell der Endotoxämie wurde in der Vergangenheit sehr oft verwendet. Aufgrund der Aktivierung der proinflammatorischen Immunantwort des Wirtsorganismus durch das Endotoxin (z. B. Lipopolysaccharide, LPS) kann die Sofortreaktion bzw. die initiale, klinische Symptomatik einer Sepsis (SIRS, siehe **Abb. 1**) untersucht werden (Wichterman et al. 1980, Remick et al. 2000, Cohen 2002, Rittirsch et al. 2008). Die Bakteriämie-Modelle wie peritoneale Kontamination und Infektion (PCI) und caecale Ligation und Punktion (CLP) zeigen ähnliche

Merkmale wie in einem humanen septischen Erkrankungsbild (Buras et al. 2005). Bei der PCI wird eine definierte Qualität und Quantität einer Bakteriensuspension dem Versuchstier appliziert, während bei der CLP eine gemischte und undefinierte Pathogenflora induziert wird. Das CLP-Modell hat die größte klinische Relevanz und gilt als das ideale Sepsis-Modell, um eine humane, mittelschwere Sepsis (siehe **Abb. 1**) in einem Tiermodell zu simulieren (Wichterman et al. 1980).

1.3 Nierenfunktion

Die Niere ist ein paarig angeordnetes Organ, das eine besondere Bedeutung für die Homöostase der extrazellulären Flüssigkeit, des Blut pH-Wertes, des Wasser- und Elektrolythaushalts des Körpers hat. Um die Nierenfunktion aufrecht zu erhalten, ist eine hohe Durchblutung der Nieren notwendig. Die Nieren, v. a. die Nierenrinde, werden von 20-25% des Herzminutenvolumens durchströmt (Regan et al. 1995). Damit ist einerseits die enorme Filtrationsfunktion der Niere gewährleistet, um harnpflichtige Substanzen wie Harnstoff, Kreatinin, und Fremdstoffe auszuschcheiden und nicht harnpflichtige Stoffe wie Aminosäuren oder Glukose im Tubulussystem rückzuresorbieren. Andererseits kommt der Niere eine weitere besondere Aufgabe zu in der Überwachung des Sauerstoffgehalts im Blut über das Hormon Erythropoetin (Haase 2010, Bunn 2013). Dadurch kann die Anzahl der Erythrozyten und somit die Sauerstoffverfügbarkeit unter hypoxischen Bedingungen erhöht werden. Trotz des enormen Blutstroms durch die Nieren, weist die renale Medulla den geringsten physiologischen PaO_2 von 20 bis <10 mmHg auf im Vergleich zum Nierenkortex mit 30-50 mmHg und anderen Organen (Brezis und Rosen 1995, Lubbers und Baumgartl 1997). Der Blutfluss und der Sauerstoffverbrauch sind konstant bei einem stabilen kortikomedullären Sauerstoffgradient und einem relativ geringen Gewebe- PaO_2 (Wenger und Hoogewijs 2010). Bei einem geringen Druckabfall ist der renale Blutfluss beeinträchtigt (Rosenberger et al. 2006) und die Exposition gegenüber einem Hypoxieschaden des Nierengewebes erhöht. Dem entgegenzuwirken besitzen die Nierenzellen verschiedene molekulare Mechanismen. Ein Beispiel dafür ist der HIF-

Signalweg. Der Transkriptionsfaktor HIF spielt eine zentrale Rolle in der zellulären Adaptation an hypoxische Verhältnisse (Haase 2013).

In **Abbildung 2** ist der makro- und mikroskopische Aufbau (**Abb. 2A**) bis hin zur kleinsten funktionellen Einheit, dem Nephron (**Abb. 2B**), einer humanen Niere gezeigt. Die Blutfiltration beginnt in den Nierenkörperchen, den Glomeruli (**Abb. 2C**).

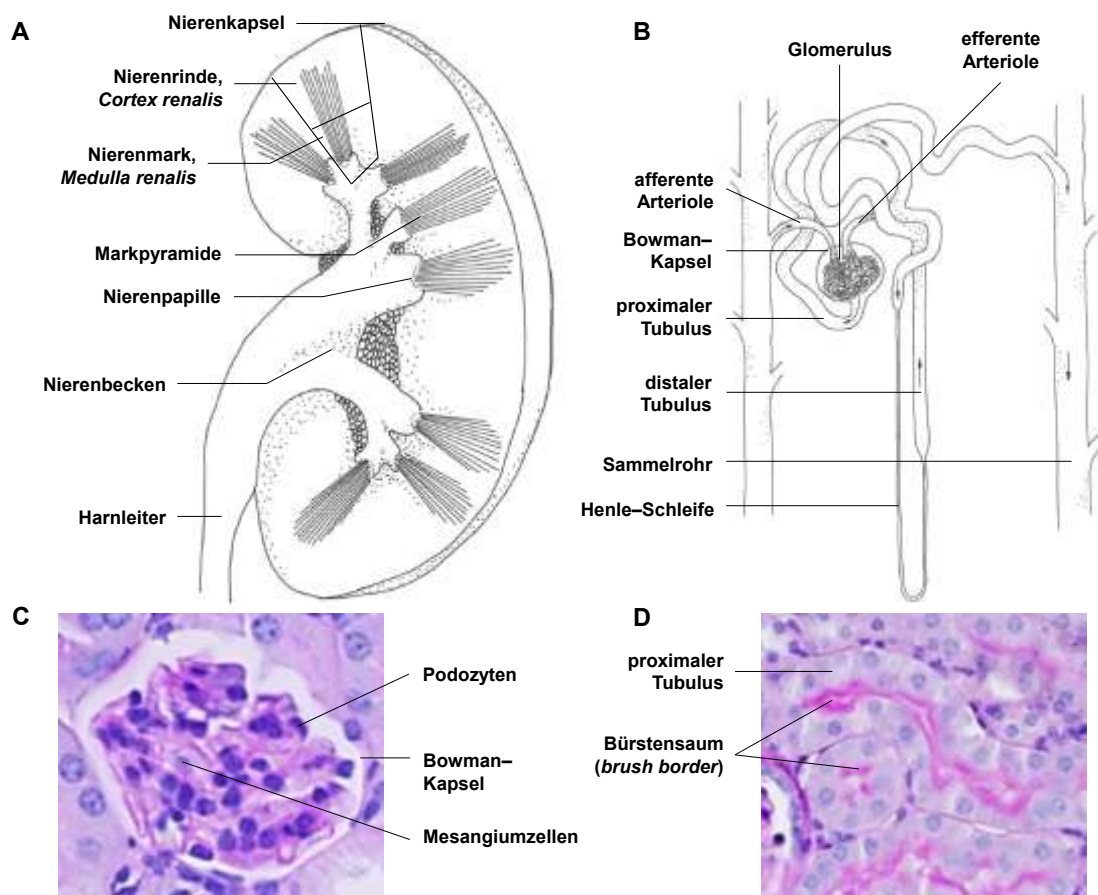


Abbildung 2: Der Makro- und mikroskopische Aufbau einer humanen Niere. (A) Querschnittsansicht der Niere. (B) Aufbau der kleinsten funktionellen Einheit, dem Nephron, der Niere. (C) Glomerulus. (D) Tubuli. Illustration und Beschriftung nach (Regan et al. 1995, Bulger 1986).

Der hier gebildete Primärharn (glomeruläres Ultrafiltrat) gelangt in die proximalen Nierenkanälchen, die Tubuli (**Abb. 2D**), zur weiteren Modifikation (Bulger 1986). Das glomeruläre Ultrafiltrat wird gezielt durch Resorption v. a. von Wasser und gelösten Stoffen bzw. durch Sekretion von organischen Säuren und Ammoniak in den proximalen Tubuli (Green und Giebisch 1984), im

geringen Maße auch in der Henle–Schleife und in den distalen Tubuli konzentriert (Bulger 1986, Capasso et al. 2002). Die distalen Tubuli speisen die Sammelrohre, in denen die endgültige Harnkonzentration eingestellt wird (Bulger 1986).

1.4 Bedeutung von *MORG1* und *HIF-1 α* in der Sepsis induzierten Nierenschädigung

1.4.1 Allgemeine und physiologische Bedeutung von *MORG1* und *HIF-1 α*

Das molekulare Gerüstprotein *MORG1* [*mitogen-activated protein kinase* (MAPK) *organizer 1*] ist ein Mitglied der *β -transducin WD-40 repeat* Proteinfamilie mit 7 Wiederholungen der WD-Domäne (Hopfer et al. 2006, Stahr et al. 2012). *MORG1* wurde als ein Bindungspartner von dem Gerüstprotein *MP1* (*MAPK kinase 1-inter-acting protein 1*) isoliert, das in den MAPK–Signalweg involviert ist (Vomastek et al. 2004). Später wurde durch Hopfer et al. seine Interaktion und Koloalisation mit der Prolylhydroxylase (PHD) 3 im Nukleus und im Zytoplasma von Mammaliazellen in differenten Gewebearten gefunden. *MORG1* stabilisiert die Prolylhydroxylase 3 und vermittelt deren Aktivität (Hopfer et al. 2006). Unter normoxischen Konditionen fördert das aktivierte PHD3 die rasche Degradation der zwei Isoformen *HIF-1 α* und *HIF-2 α* in den Nieren und im Gehirn (Appelhoff et al. 2004, Hammerschmidt et al. 2009, Haase et al. 2009). *MORG1* und PHD3 haben ähnliche Expressionsmuster und wurden in verschiedenen Organen wie Gehirn, Herz, Skelettmuskel, Niere, Leber, Milz und Lunge gefunden (Oehme et al. 2002, Lieb et al. 2002, Freeman et al. 2003). Die Untersuchungen von Hammerschmidt et al. zeigten außerdem, dass *MORG1* die Aktivität von *HIF-1 α* verringert und bis auf den basalen Level reduziert, wenn *MORG1* mit PHD3 interagiert (Hammerschmidt et al. 2009). Bisher wurden 3 verschiedene Isoformen (PHD1, PHD2 und PHD3) entdeckt (Takeda et al. 2008). Die PHD–Aktivität wird nicht nur durch O₂ moduliert, sondern auch durch metabolische Intermediäre Substanzen oder PHD–Kofaktoren wie reaktive Sauerstoffspezies, Ascorbinsäure, Succinat, Fumarat und Stickstoffoxid. Zudem reguliert die E3–Ligase Siah (*seven in absentia homolog*) die Stabilität von PHD1 und PHD3

(Gunaratnam und Bonventre 2009). Ein weiterer Regelmechanismus scheint über HIF-1/2 α stattzufinden. Aprelikova et al. zeigten eine Verminderung der PHD3-Expression aufgrund der Herunterregulation von HIF-1 α und HIF-2 α durch siRNS (*small interfering* Ribonukleinsäure) nach 4h Hypoxie (Aprelikova et al. 2004). Der Abbau von PHD3 unterliegt ebenso der proteasomalen Degradation (Borden 2000). HIF wurde in den meisten humanen, Ratten- und Mausgeweben u. a. in der Niere gefunden (Wang und Semenza 1993a, Wiener et al. 1996) und scheint eine zentrale Rolle in der Adaptation an ein niedriges Sauerstoffangebot zu spielen und reguliert damit die Sauerstoff-Homöostase (Semenza 2000). Da *Hif-1 α* kontinuierlich exprimiert wird und das HIF-Protein ständig abgebaut wird, unterliegt HIF-1 α einer strengen Regulation (Wang et al. 1995, Jeong et al. 2002). Unter konstanter oder extremer Hypoxie reguliert HIF seine eigene Degradation über PHD, indem HIF die Transkription von PHD fördert. Diese Rückkopplung dient einer schnellen, aber kontinuierlichen und sauerstoffunabhängigen Degradation von HIF (Marxsen et al. 2004). Erst bei einem Stimulus wird das HIF-Protein modifiziert und stabilisiert (Wenger et al. 1997, Blouin et al. 2004). Wang und Semenza zeigten erstmals die Induktion der Aktivität von HIF-1 α in nicht-EPO produzierenden Zellen und das HIF-1 α bei Hypoxie die Transkription von vielen Genen aktiviert (Wang und Semenza 1993b, Wang und Semenza 1996). Die Übersichtsarbeit von Nakayama und andere Arbeiten zeigten zusätzliche fördernde und hemmende Einflüsse, die die HIF-Aktivität modulieren. Beispielsweise induzieren ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), Wachstums-faktoren, Zytokine oder Onkogene wie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) die transkriptionelle Aktivität von HIF- α . Auch über den NF- κ B-Signalweg werden neben dem HIF-Signalweg Hypoxie vermittelte Gene induziert. Angiotensin II induziert ebenfalls die HIF-1 α -Aktivität in verschiedenen Zelltypen u. a. in renalen Zellen (Wolf et al. 2004, Nakayama 2009, Demidenko und Blagosklonny 2011, Bondeva et al. 2013). Homolog zum HIF-1 α wurden zwei weitere Hypoxie induzierte Faktoren, HIF-2 α (Ema et al. 1997) und HIF-3 α (Gu et al. 1998), gefunden. Deren Expression ist aber eher spezialisiert bzw. limitiert (Semenza 2000). Zu HIF-3 α ist bisher nicht viel bekannt (Ke und Costa 2006). Das Protein besitzt keine

Transaktivationsdomäne und scheint eher die HIF vermittelte Genexpression zu regulieren (Makino et al. 2001).

Die **Abbildung 3** zeigt die sauerstoffabhängige Regulation von HIF-1 α und die Beziehung zu MORG1 und PHD3. Bei herrschender Normoxie unterliegt HIF-1 α den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg. Die Interaktion mit MORG1 vermittelt die Aktivierung von PHD3 (Hopfer et al. 2006, Hammerschmidt et al. 2009), die notwendig ist für die Hydroxylierung der Prolylreste Pro402/564 der HIF-1 α -ODD (*oxygen dependent degradation*)-Domäne durch PHD3 (Huang et al. 1998, Ivan et al. 2001, Jaakkola et al. 2001). PHD3 benötigt dazu Substrate wie O₂ und 2-Oxoglutarat (2-OG, Zwischenprodukt des Krebszyklus) sowie zweiwertiges Eisenkation (Fe²⁺) als Kofaktor. Das fördert die Bindung von HIF-1 α an den von-Hippel-Lindau (pVHL)-Komplex (Yu et al. 2001, Epstein et al. 2001). Das Protein VHL ist ein Substrat von dem E3-Ligasekomplex, der dann an die ODD-Domäne vom HIF-1 α bindet (Cockman et al. 2000). Der Ligasekomplex besteht aus Cullin2, Elongin C und Rbx1 (*ring-box protein*) (Kallio et al. 1999, Cockman et al. 2000, Gunaratnam und Bonventre 2009). Damit ist die Voraussetzung für die anschließende Ubiquitinierung von HIF-1 α gegeben (Huang et al. 1998), welches dann über das 26S-Proteasom degradiert wird (Gunaratnam und Bonventre 2009). Die Arbeit von Wenger fasst die Interaktionen von HIF-1 α mit Proteinen wie p53 oder Hsp90 (*heat shock protein 90*) unter normoxischen Bedingungen zusammen (Wenger 2002). Unter milden hypoxischen und normoxischen Verhältnissen hydroxyliert eine Asparaginyhydroxylase FIH (*factor inhibiting HIF*, ARD1) einen Asparagin-Rest (Asn803/851) in HIF-1 α und HIF-2 α , um die HIF-Protein-Aktivität zu dämpfen bei moderater Hypoxie (Lando et al. 2002, Koivunen et al. 2004). FIH ist in renalen Tubulusepithelzellen und in den Glomeruli exprimiert (Soilleux et al. 2005).

Bei Hypoxie wird die Proteasom vermittelte Degradation inhibiert, sodass HIF-1 α stabilisiert wird und akkumuliert (Kallio et al. 1998, Huang et al. 1998), ohne dass die *Hif*-1 α -mRNS (messenger RNS) hochreguliert wird (Wenger et al. 1997). Die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α erfordert die Inhibierung der posttranskriptionellen Hydroxylierung der α -Untereinheit (Brahimi-Horn und

Pouyssegur 2009). Bei insuffizienter Sauerstoffbereitstellung in hypoxischen Geweben sind die PHD-Isoformen und FIH inaktiv. Durch posttranskriptionelle Proteinphosphorylierung der *Hif-1 α* -mRNS (Wenger 2002) und durch Modifikationen des HIF-1 α -Proteins wird dieses stabilisiert und im Zytoplasma akkumuliert (Huang et al. 1996, Kallio et al. 1997). Über einen aktiven, energieabhängigen Transport transloziert HIF-1 α in den Nukleus. Dabei präsentiert das stabilisierte HIF-1 α ein Sequenzmotiv (*nuclear localisation signal*, NLS) und bindet an den Kernporenkomplex (Vandromme et al. 1996, Kallio et al. 1998). Die Untersuchung von Kallio et al. zeigte eine Transferdauer von ca. 1 Stunde (Kallio et al. 1998). Im Zellkern bildet HIF-1 α einen *basic helix-loop-helix* (bHLH), heterodimeren Transkriptionsfaktor (Jiang et al. 1996), der aus einer labilen *alpha* (HIF-1 α) und einer stabilen *beta* (HIF-1 β) Untereinheit ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) besteht (Hoffman et al. 1991, Wang et al. 1995, Eguchi et al. 1997). Dabei ist die Bindung von HIF-1 α an HIF-1 β spezifisch, während HIF-1 β weitere bHLH-Proteine binden kann (Swanson et al. 1995, Jiang et al. 1996). Über die N- und C-terminale Transkription-Aktivierungsdomänen (NAD, CAD) von HIF-1 α und HIF-2 α wird unter hypoxischen Bedingungen die Bindung an das cAMP response element-binding protein (CBP) reguliert (Ema et al. 1999). Die zusätzlichen Faktoren p300 (Arany et al. 1996), SRC-1 und TIF2 sowie Ref1 (Carrero et al. 2000) sind erforderlich, um die funktionelle Form des HIF-Dimers zu bewahren (Kallio et al. 1998). Die beiden Kofaktoren des HIF-Dimers CBP/p300 sind Histonacetyltransferasen, die die Chromatinstruktur im Genomloкус öffnen (Wenger 2002). Das stabilisierte Heterodimer bindet im HRE (*hypoxia response element*) in der Promotorregion der Zielgene (Guillemin und Krasnow 1997, Wenger und Gassmann 1997) und induziert die Transkription von über 70 Genen (Wenger et al. 2005). Die Proteinprodukte dieser Gene sind wichtig für die Zellproliferation, die Apoptose, die Erythropoese, den Energie-, Eisen- und Glukosemetabolismus, die Immunreaktion, die Zytokinproduktion, die Vaskularisation, die pH-Regulation und die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion (Semenza 2001, Rosenberger et al. 2006, Haase 2006).

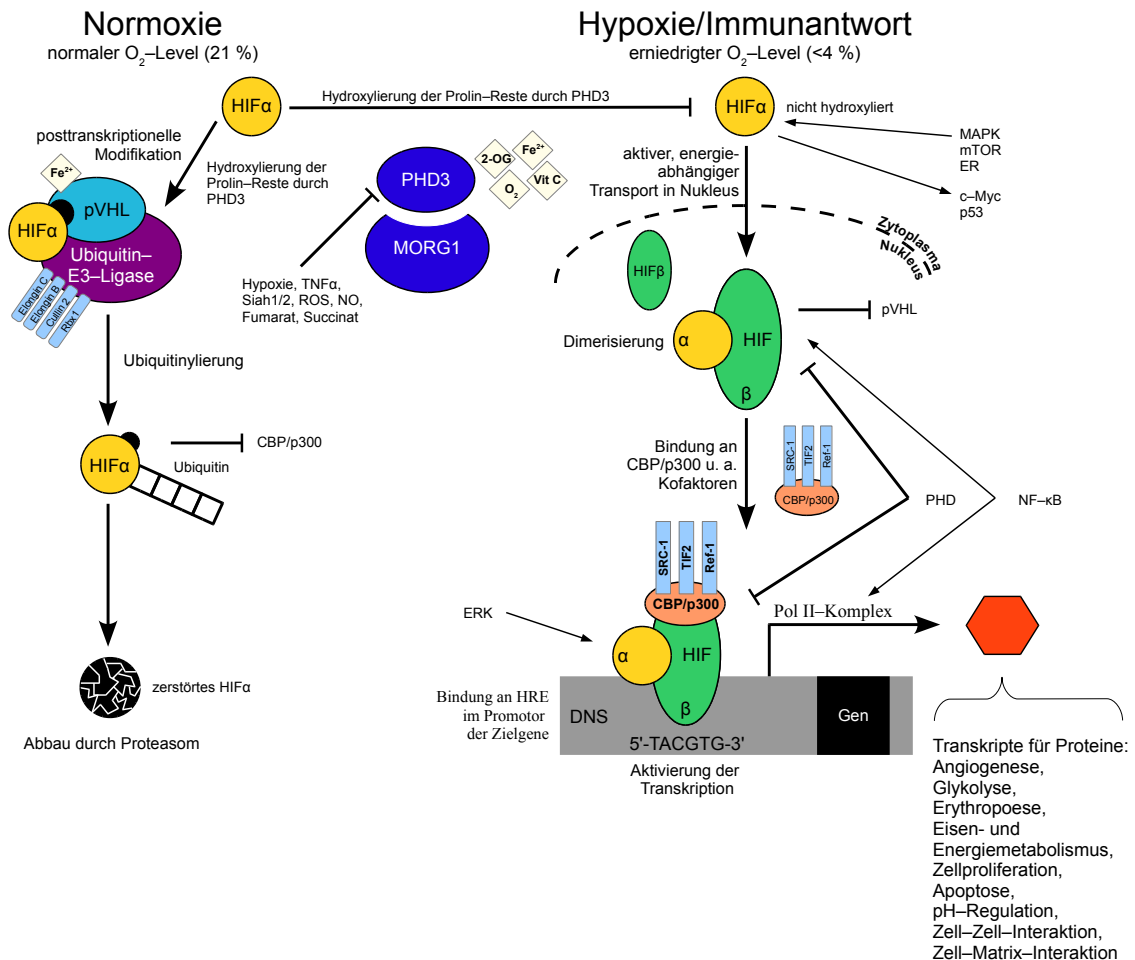


Abbildung 3: Modell der Beziehung zwischen MORG1, PHD3 und HIF-1α. CBP, *cAMP response element-binding protein*. c-Myc, c-Myelocytomatose. EPO, Erythropoetin. ER, endoplasmatisches Retikulum. ERK, *extracellular signal-regulated kinase*. Fe²⁺, zweiwertiges Eisenion. HIF, *hypoxia inducible factor*. HRE, *hypoxia response elements*. MORG1, MAPK organizer 1. mTOR, *mammalian target of rapamycin*. NF-κB, *nuclear factor-kappa B*. NO, Stickstoffmonoxid. 2-OG, 2-Oxoglutarat. O₂, Sauerstoff. PHD, Prolylhydroxylase. Pol II, Polymerase II. p53, Tumorsuppressor. p300, Histone-Acetyltransferase-Domäne. Rbx1, *ring-box protein 1*. Ref-1, *redox effector factor-1*. ROS, reaktive Sauerstoffspezies. Siah, *seven in absentia homolog*. SRC-1, *steroid receptor coactivator-1*. VEGF, *vascular endothelial growth factor*. pVHL, von-Hippel-Lindau. Vit C, Ascorbinsäure. Illustration nach (Haase 2006, Gorchach und Bonello 2008, Nakayama 2009, Gunaratnam und Bonventre 2009, Wenger und Hoogewijs 2010).

1.4.2 Nierenspezifische und pathophysiologische Bedeutung von MORG1 und HIF-1α

Die adaptive physiologische und pathophysiologische Antwort auf hypoxische Verhältnisse im Gewebe durch HIF-1α über die Förderung der Transkription diverser Gene wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt (Wang und Semenza 1993a, Wang und Semenza 1996, Jiang et al. 1996, Forsythe et al.

1996). HIF-1/2 α sind für die Embryo- und Nephrogenese erforderlich (Maltepe et al. 1997, Ryan et al. 1998, Iyer et al. 1998, Tian et al. 1998). In dem ANV-Mausmodell durch renale Ischämie/Reperfusion konnte eine protektive Wirkung in *Morg1*^{+/-}-Mäusen gegen renale Apoptose und tubuläre Schädigung mit der Erhöhung von HIF-1/2 α und den Plasmakonzentrationen von EPO gezeigt werden. Weiterhin wurde eine verminderte Nierenentzündung und weniger proinflammatorische Zytokine sowie eine verbesserte Nierenfunktion in den heterozygoten Tieren beobachtet im Vergleich zu den Wildtypmäusen nach Ischämie/Reperfusion (Hammerschmidt et al. 2009). Bernhardt et al. konnten eine protektive Wirkung gegen ischämische Gewebeschäden durch Inhibierung der HIF-Degradation aufgrund einer Hypoxie und PHD-Inhibierung nachweisen (Bernhardt et al. 2006b). Bergeron et al. zeigten die Induktion von HIF-1 α und seiner Zielgene aufgrund einer Ischämie im Rattenhirn im gleichen Areal des Schlaganfalls (Bergeron et al. 1999). In einem weiteren Mausmodell der Arterienokklusion im Gehirn konnte durch Stahr et al. eine protektive Wirkung gegenüber der ischämischen Einwirkung in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen gezeigt werden verglichen mit Wildtyptieren (Stahr et al. 2012). In weiteren *in vivo*-Studien wurde die protektive Wirkung von HIF in der Niere beschrieben (Schley et al. 2011, Wang et al. 2012, Kobayashi et al. 2012). Kontrovers dazu sind die Untersuchungen bei gezielter Deletion des HIF-1 α -Gens in T-Zellen (Myeloidzellen) von Mäusen. HIF ist essentiell für die Generation von zellulärem ATP in diesen Zellen (Kong et al. 2004). Die Mäuse waren vor einer Gewebeschädigung in der Milz geschützt, möglicherweise aufgrund der ausgebliebenen, antibakteriellen Immunantwort durch die T-Zellen. Das resultierte in einer verbesserten Überlebensrate (Thiel et al. 2007). Eine verstärkte antibakterielle Abwehr und verbessertes Überleben nach Sepsis-Induktion im CLP-Modell zeigten Georgiev et al., wenn in den T-Zellen gezielt eine Isoform von HIF-1 α genetisch ausgeschaltet wurde (Georgiev et al. 2012). Imtiyaz et al. zeigten in myeloidspezifischen HIF-2 α -Nullmäusen ebenso einen Vorteil im Vergleich zu den Wildtyptieren. Die Nullmäuse waren unempfindlicher gegenüber LPS induzierender Endotoxämie aufgrund der ausgebliebenen, überschwelenden, proinflammatorischen Antwort (Imtiyaz et

al. 2010). Experimente mit PHD3–*knockout*–Mäusen konnten diese Ergebnisse bestätigen (Kiss et al. 2012). Dennoch zeigten Untersuchungen, dass durch eine präkonditionale Aktivierung von HIF durch Induktion einer Gewebhypoxie (z. B. via Kohlenstoffmonoxid–Behandlung) die ischämische, akute Nierenschädigung, Kreatinin und Harnstoff–Stickstoff im Serum sowie Apoptose nach 24h verbessert waren verglichen mit den Kontrolltieren (Bernhardt et al. 2006b). Bergeron et al. veröffentlichten, dass induziertes HIF–1 α , 24h vor der Ischämie, die Hypoxie vermittelte zerebrale Schädigung reduziert (Bergeron et al. 2000). In einem weiteren Modell wurde eine protektive Wirkung gegenüber durch Endotoxin induzierten ANV in diabetischen Mäusen belegt. Die Induktion eines Diabetes wurde von Ortega et al. als eine Präkonditionierung der Niere beschrieben und mit der Erhöhung von HIF–1 α im Gewebe erklärt (Ortega et al. 2013). Im Kontext dieser Dissertationsarbeit soll der Einfluss von HIF–1 α in *Morg1*^{+/-}–Mäusen in der Sepsis induzierten Nierenschädigung analysiert werden.

2 Ziele der Arbeit

- In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von MORG1 und HIF-1 α bzw. das voraktivierte HIF-1 α in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen in der Sepsis analysiert werden. Da noch keine Vorkenntnisse zu MORG1 und Sepsis bekannt sind, sollten zwei verschiedene Sepsis-Modelle und ein Modell der Endotoxämie klären, in welchem dieser Modelle MORG1 und HIF den größten Effekt im Sepsis assoziierten akuten Nierenversagen hat.
- MORG1 ist ein Gerüstprotein, das über seine Interaktion mit PHD3 den proteasomalen Abbau von HIF-1 α reguliert. In diesem Zusammenhang sollte die Gen- und Protein-Expression von MORG1 und HIF-1 α sowie involvierter Proteine wie HIF-2 α , PHD3, EPO, GLUT1 und VEGF nach Sepsis-Induktion oder LPS-Gabe analysiert werden.
- In verschiedenen Mausmodellen der Hypoxie oder der Ischämie/Reperfusion wurden HIF-1/2 α vermittelte protektive Effekte in der Niere gegenüber Nekrose und Apoptose gezeigt. Deshalb sollte der Einfluss von MORG1 und HIF-1 α auf die möglichen nekrotischen und apoptotischen Veränderungen im Nierengewebe aufgrund der Sepsis-Induktionen bzw. LPS-Applikation betrachtet werden.
- Weiterhin sollte der Effekt von MORG1 und HIF-1 α auf die Infiltration bzw. Inflammation im Nierengewebe als mögliche Immunantwort auf die CLP-, PCI- und LPS-Behandlung beurteilt werden. Da die Sepsis eine generalisierte Entzündungsreaktion mit dysregulierter Immunantwort ist, sollten zudem verschiedene Zytokine im Blutplasma gemessen werden.
- Um eine protektive Wirkung von HIF-1 α bzw. die Herunterregulation von MORG1 auf die Nierenfunktion zu bewerten, wurden verschiedene Parameter der Nierenfunktion im Urin und Blutplasma gemessen.
- Die systemische Auswirkung der Reduktion der MORG1-Expression bzw. HIF-1/2 α -Aktivierung auf die Überlebensrate sollte in zwei Sepsis-Modellen und Endotoxämie über 72h betrachtet werden, da hierzu keine Vorkenntnisse bekannt sind.

3 Methoden

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

In dieser Arbeit wurden Mäuse des robusten Inzuchtstammes C57 *black* 6 (C57/BL6, Charles River) verwendet. Heterozygote *Morg1* (*Morg1*^{+/-})-Mäuse wurden durch homologe Rekombination (Bishop et al. 2008) durch standardisierte Techniken hergestellt (Hammerschmidt et al. 2009). Diese Tiere weisen den gleichen Phänotyp wie Wildtypmäuse auf. Homozygote *Morg1*-Mäuse sind im Embryonalstadium (Tag 10,5) letal (Hammerschmidt et al. 2009) aufgrund diffuser Vaskularisation in den Embryonen (Hopfer U, Wolf G, unpubliziert). Zur Charakterisierung des Genotyps wurden alle Tiere vor dem Experiment analysiert. Die Wurfgeschwister, die keine Deletion des *Morg1*-Gens hatten, wurden als Vergleichsgruppe bzw. als Wildtyp verwendet. Alle Tiere blieben über den gesamten Versuchszeitraum von 24h unter sterilen Bedingungen in der Sektion für Kleintiere, Jena und hatten freien Zugang zu Wasser und Mausfutter *ad libitum*.

Alle Tierexperimente waren geprüft und genehmigt durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz mit der Registrier-Nummer: 02-023/10 (Zusatz 02-023/11) und wurden unter Beachtung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.2 Tierexperimentelles Protokoll

3.2.1 Versuchsgruppen

Für die Studien wurden drei Tiermodelle verwendet, um verschiedene Folgen bzw. Entstehungsmöglichkeiten eines Sepsis induzierten Nierenversagens zu untersuchen. Um einen möglichen hormonellen Einfluss auszuschließen, wurden nur männliche Mäuse untersucht. Die Versuchstiere wurden je Maus-Genotyp in zwei Behandlungsgruppen geteilt. Sepsis wurde induziert durch CLP oder PCI. Mit der Applikation von LPS wurde eine systemische Inflammation bzw. SIRS hervorgerufen. Für das CLP-Modell wurden die Mäuse der Kontrollgruppen beider Genotypen in einer sham-CLP-Operation (OP) ohne Ligation und Punktion des Caecums behandelt. Den Kontrolltieren des PCI-

bzw. LPS-Modells wurde eine Injektion von 0,9%igem Natriumchlorid intraperitoneal appliziert. Eine genaue Übersicht der tierexperimentellen Versuchsgruppen ist in der **Tabelle 1** zusammengefasst.

Tabelle 1: Tierexperimentelle Versuchsgruppen. CLP, caecale Ligation und Punktion. PCI, peritoneale Kontamination und Infektion. LPS, Lipopolysaccharide.

<i>Genotyp</i>	<i>Unbehandelt</i>	<i>Behandelt</i>	<i>Gesamt</i>
Wildtyp	9 für Kontrolle CLP mit sham CLP; 9 für Kontrolle PCI bzw. LPS mit 0,9%igem NaCl	12 für CLP-Modell; 12 für PCI-Modell; 12 für LPS-Modell	54
<i>Morg1^{+/-}</i>	9 für Kontrolle CLP mit sham CLP; 9 für Kontrolle PCI bzw. LPS mit 0,9%igem NaCl	12 für CLP-Modell; 12 für PCI-Modell; 12 für LPS-Modell	54

Die Studien zum Überleben in den drei Behandlungsmodellen CLP, PCI und LPS in den Mäusen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden durchgeführt. Die Versuchstiere beider Genotypen umfassten 100 Tiere, die in 5 Tiergruppen unterteilt wurden. Die **Tabelle 2** zeigt die verschiedenen Versuchsgruppen der Überlebensstudien. Nach den jeweiligen Behandlungen wurden die Mäuse in Käfigen mit freiem Zugang zu Mausfutter und Wasser gehalten. Die Volumentherapie sah eine NaCl-Applikation von 0,9%igem NaCl (25 ml/kg KG) 6h nach den jeweiligen Behandlungen und dann alle 12h vor. Stark leidende Tiere wurden vorzeitig aus dem Experiment genommen bzw. nach 72h die überlebenden Versuchstiere fach- und tierschutzgerecht getötet. Die Überlebensrate wurde mit der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet.

Tabelle 2: Versuchsgruppen der Überlebensstudien. CLP, caecale Ligation und Punktion. PCI, peritoneale Kontamination und Infektion. LPS, Lipopolysaccharide.

<i>Genotyp</i>	<i>Unbehandelt</i>	<i>Behandelt</i>	<i>Gesamt</i>
Wildtyp	10 für Kontrolle CLP mit sham CLP; 10 für Kontrolle PCI und LPS mit 0,9%igem NaCl	10 für CLP; 10 für PCI; 10 für LPS	50
<i>Morg1^{+/-}</i>	10 für Kontrolle CLP mit sham CLP; 10 für Kontrolle PCI und LPS mit 0,9%igem NaCl	10 für CLP; 10 für PCI; 10 für LPS	50

3.2.2 Narkose

Eine Anästhesie wurde bei den Tieren der Gruppe CLP (sham–CLP– und CLP–OP) und bei allen Tieren zur Vollblutgewinnung angewendet. Narkotisierte Tiere, die einer sham–CLP– oder einer CLP–OP unterzogen waren, erhielten im Anschluss des Eingriffes ein Antidot. Die Zusammensetzung des Narkosemittels und des Antidots war wie folgt:

Narkosemittel (i. p.):	Medetomidin (0,5 mg/kg KG)
	Midazolam (5,0 mg/kg KG)
	Fentanyl (0,05 mg/kg KG)
Antidot (s. c.):	Atipamezol (2,5 mg/kg KG)
	Flumazenil (0,5 mg/kg KG)
	Naloxon (1,2 mg/kg KG)

3.2.3 Behandlungen

3.2.3.1 Caecale Ligation und Punktion (CLP)

Die caecale Ligation und Punktion ist das ideale Sepsis–Modell, um eine Peritonitis und folglich eine humane mittelschwere Sepsis in einem Tiermodell zu simulieren (Wichterman et al. 1980). Dieses polymikrobielle Sepsis–Modell bewirkt eine bakterielle Kontamination des Abdomen, provoziert eine Infektion des Blutkreislaufes und ein Sepsis assoziiertes akutes Nierenversagen (Yasuda et al. 2008). Durch diese chirurgisch invasive Methode kann der typische hämodynamische Zustand einer Sepsiserkrankung und die dabei veränderte immunologische Situation im Tiermodell reproduziert werden (Buras et al. 2005, Rittirsch et al. 2009).

Die narkotisierten Versuchstiere wurden auf dem OP–Tisch fixiert. Anschließend folgte die Desinfektion des OP–Umfeldes. Das Abdomen der Mäuse wurde desinfiziert und 1 cm unterhalb des Sternums für ca. 1 cm entlang der *linea alba* eröffnet. Danach wurde das Caecum nach außen luxiert. Bei der Sepsis induzierenden CLP–OP wurde dem Blinddarm 1/3 distal eine Ligatur gesetzt. Dadurch wird ein Teil des Caecums vom restlichen Blinddarm abgeschnürt und ein Nachschub von Darminhalt verhindert. Mit einer 21G–

Kanüle wurde unterhalb der Ligatur am Caecum durch-und-durchgestochen. Direkt nach dem Herausziehen der Kanüle wurden durch mittelfesten Druck zwei Papillen Faeces (je ca. 1 mm³) mit ungewisser Anzahl und Zusammensetzung der Keime aus der Ein- und Ausstichstelle gedrückt. Nach der Beschreibung von Otero-Anton et al. kann damit eine mittelschwere Sepsis hervorgerufen werden (Otero-Anton et al. 2001). Ohne die Papillen zu zerstören, wurde der Blinddarm wieder in die Bauchhöhle verlagert. Bei einer sham-CLP-OP wurde das Caecum ohne Ligatur und Punktion in die Kavität des Abdomens zurückgelegt. Abschließend wurde den Tieren bei sham-CLP- und Sepsis induzierender CLP-OP das Abdomen mit Knopfnähten verschlossen und ein Antidot (siehe Pkt. 3.2.2) *sub cutan* appliziert.

3.2.3.2 Peritoneale Kontamination und Infektion (PCI)

Das zweite Sepsis-Modell ist eine peritoneale Kontamination und Infektion durch Applikation einer humanen Faeces-Suspension, die zu einer Infektion des Peritoneums und einer Sepsis führen kann (Sleeman et al. 1969, Perkash et al. 1970). Auch bei diesem Sepsis-Mausmodell treten ein typisch hämodynamischer Zustand einer Sepsiserkrankung und die dabei veränderte immunologische Situation auf (Browne und Leslie 1976). Im Gegensatz zu dem CLP-Modell ist bei dem PCI-Modell die Keimanzahl und -zusammensetzung bekannt. Die Faeces-Suspension wurde auf der Grundlage von Lorenz (Lorenz et al. 1994) durch die Arbeitsgruppe der experimentellen Anästhesie (UKJ/KAI, Jena) angefertigt und auf Qualität und Quantität der Kultur von Mikroorganismen mikrobiologisch geprüft. Die Analyse erfolgte durch das mikrobiologische Labor (UKJ, Jena). Die Gesamtkeimzahl betrug $3,4 \times 10^{10}$ KbE/ml lt. Untersuchung vom November 2010.

Die gebrauchsfertige Faeces-Suspension wurde mit einer Menge von 1,5 ml/kg KG der Maus i. p. in einer Einmalapplikation verabreicht.

3.2.3.3 Lipopolysaccharide (LPS)

Um eine systemische Inflammation zu untersuchen, wurde ein Lipopolysaccharid-Präparat des Bakterienstammes *Escherischa Coli* (Serotyp 0111:B4L3012, Sigma-Aldrich) verwendet. Lipopolysaccharide sind der

biologisch aktive Membranbestandteil gram-negativer Bakterien. Diese Bakterienbestandteile zeigen proinflammatorische Aktivität (Sparwasser et al. 1997, Herwald et al. 1998, Bauer et al. 2001). LPS wird von dem LPS bindenden Protein (LBP) gebunden und über CD14 (*cluster of determination* 14) verschiedener Rezeptoren der TLR (*toll like receptor*)–Familie präsentiert. Darüber wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die eine direkte, hochschnellende Entzündungsantwort zur Folge hat. Eine Reihe von inflammatorischen Zytokinen werden freigesetzt, die dann das Krankheitsbild eines SIRS induzieren können (Fang et al. 2013).

Das LPS-Präparat wurde in einem Ultraschalbad für 3 min homogenisiert und dann in einer einmaligen Applikation sowie einer Konzentration von 10mg/kg KG Maus i. p. injiziert.

Die Beobachtung und die Dokumentation der äußeren Gestalt durch Fotografie des eröffneten Abdomens gaben Aufschluss über die erfolgreiche Induktion einer Peritonitis aufgrund der Sepsis-Methoden bzw. LPS-Injektion.

Die **Abbildung 4** zeigt eine eröffnete septische Maus nach PCI-Behandlung. Die hervorgerufene Peritonitis mit Gewebeveränderungen an Organen wie Kolon, Leber und Milz sind deutlich erkennbar. Das gläsern-veränderte Kolon und das schwarz-verfärbte Caecum weisen auf entzündliche und nekrotische Vorgänge im Bauchraum, verursacht durch die PCI-Behandlung, hin. Eine leicht vergrößerte Milz aufgrund der Sepsis-Induktion konnte ebenfalls festgestellt werden (nicht gezeigt).

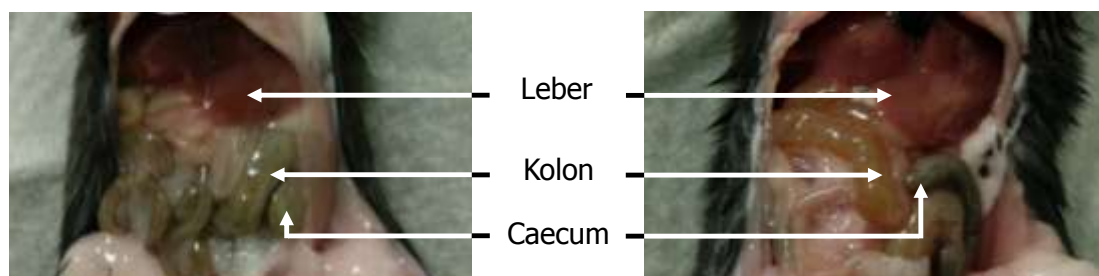


Abbildung 4: Repräsentative Bilder einer gesunden und einer septischen Maus. Das gläsern-veränderte Kolon und das schwarz-verfärbte Caecum weisen auf entzündliche Vorgänge im Bauchraum, verursacht durch Sepsis-Induktion, hin (**rechtes Bild**) im Vergleich zu einem NaCl behandelten Tier (**linkes Bild**). Das rechte Bild ist stellvertretend auch für CLP behandelte Versuchstiere.

Diese Beobachtungen wurden analog für das CLP–Modell gemacht. Ein fauliger Geruch aus dem Bauchraum unterstrich die visuelle Beurteilung. Nach LPS–Gabe waren keine makroskopischen Veränderungen am eröffneten Tier zu beobachten.

Die Behandlungen und die Haltung fanden unter sterilen Vorsichtsmaßnahmen statt. Über den gesamten Versuchszeitraum von 24h wurden die Versuchstiere *ad libitum* in einem Stoffwechselkäfig (Tecniplast, Italien) gehalten, um Sammelurin zu gewinnen.

3.2.3.4 Beurteilung des klinischen Schweregrads (*clinical severity score*, CSS)

Während des Behandlungszeitraums von 24h nach CLP–, PCI– und LPS–Behandlung wurden zu den Zeitpunkten 0h, 6h und 24h die Aktivität, das Verhalten und die Positur der Versuchstiere beurteilt (van Schaik und Abbas 2007, Gonnert et al. 2011). Die Kriterien zur Bewertung des äußeren Erscheinungsbilds sind in der **Tabelle 3** gezeigt.

Aufgrund der speziellen Haltung der Tiere in Stoffwechselkäfigen kann eine zusätzliche Belastung für die Tiere und eine Auswirkung auf die Krankheitsschwere nicht vollständig ausgeschlossen werden (Holly et al. 2006).

Tabelle 3: Kriterien zur Beurteilung des klinischen Schweregrads (CSS) der Versuchstiere.

Score	Qualität	Kriterien		
		spontane Aktivität	Reaktion auf exogene Stimuli	Positur
1	keine Anzeichen	aktiv	schnelle Bewegungen	normal
2	geringer Grad	weniger aktiv mit okkasionellen Interruptionen in der Aktivität	reduzierte Aufmerksamkeit, aber adäquate Antwort	leicht gebuckelt
3	milder Grad	langsam, schläfrig, Bewegung mit Einschränkung	limitiert und verspätet	gebuckelt
4	hoher Grad	lethargisch, motionslos, keine Bewegung	keine	stark gebuckelt

3.2.4 Entnahme und Vorbereitung von Vollblut, Niere und Urin

Das Vollblut wurde sofort nach dem Töten des sedierten Tieres durch Herzpunktion in EDTA aufgenommen. Aufgrund des massiven Blutverlustes verstarben die Tiere rasch.

Für die Herstellung von Blutplasma wurde das EDTA-Vollblut mit Aprotinin (Einsatz: 10% der Menge an Vollblut) versetzt und bei 4000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Für die Gesamt-RNS-Isolierung aus dem Vollblut wurde das Vollblut mit RNS-Lyse-Puffer versetzt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Anschließend wurden die Nieren der Versuchstiere entnommen. Die rechte Niere wurde in longitudinaler Richtung durch die Pole und dem Hilum geteilt und zu einer Hälfte in 5%igem Formaldehyd aufgenommen und für 24h bei 4°C gelagert. Nach einer zwanzigminütigen Wässerung wurden die Nierenproben durch die aufsteigender Alkoholreihe dehydriert sowie in Paraffin eingebettet und dunkel bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die zweite Hälfte der Niere wurde für die Isolation der Gesamt-RNS und dem Gesamt-Protein in geeignete Lyse-Puffer aufgenommen und bei -80°C bis zur endgültigen Verarbeitung gelagert. Die gesamte linke Niere wurde mit Tissue-Tek (Sakura) bei -80°C kryokonserviert.

Lyse-Puffer für die Gesamt-RNS-Isolation:

- RLT-Puffer (RNeasy Minikit, Qiagen) versetzt mit 1% β -Mercaptoethanol

Lyse-Puffer für die Gesamt-Protein-Isolation:

- 10 ml Complete LM-Puffer (Complete Lysis-M, Roche) enthält 100 mM Natriumorthovanadat und 1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche)

Der Urin der Versuchstiere nach 24h wurde durch die Verwendung eines Stoffwechselkäfigs und zusätzlich durch die Gewinnung von Spontanurin gesammelt und bei -80°C bis zur endgültigen Untersuchung tiefgefroren.

3.3 Histologische Methoden

3.3.1 Charakterisierung von morphologischen Veränderungen der Niere nach Sepsis-Induktion durch die PAS-Reaktion

Zum Nachweis und zur Darstellung von geweblichen Veränderungen ist die Perjodsäure Schiffs Reagenz (*periodic acid* Schiff, PAS)–Reaktion eine der wichtigsten histologischen Methoden. Im Nierenschnitt werden der Bürstensaum der luminalen Zellmembranen der renalen Tubuli PAS–positiv gefärbt, sodass mögliche Ausdehnungen und/oder Vakuolenbildung als Anzeichen einer Nekrose im Nierengewebe detektiert werden kann (Hotchkiss 1948).

Das Prinzip der PAS–Reaktion liegt in der Oxidation von unsubstituierten Glykolgruppen. Diese Glykolgruppen werden durch die wässrige Perjodsäure, als starkes Oxidationsmittel, in zwei Aldehydgruppen aufgespalten. Die fuchsin-schwefelige Säure des Schiffschens Reagenzes bindet an die Aldehydgruppen, wobei ein molekularer Umbau stattfindet. Die dabei entstehenden chromogenen Eigenschaften werden zur Visualisierung der Gewebestrukturen genutzt. Die PAS–positiven Substanzen sind Glykogen und neutrale Mukopolysaccharide des Bindegewebes und des Epithels, Muko- und Glykoproteide der Basalmembran und Glykoproteide und –lipide der Zellmembran (Stanka 1990). Der Bürstensaum der luminalen Zellmembran der renalen Tubuli werden pink und das Zytoplasma zart rosa verfärbt. So kann das Ausmaß der Nekrose im Nierengewebe detektiert werden.

Die in Paraffin eingebetteten Nierenschnitte (4 µm) wurden lt. Protokoll von baacklab (12153, baacklab) in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Nach der Inkubation mit der Perjodsäure (1%) wurden die Schnitte gewaschen und anschließend mit dem Schiffschens Reagenz behandelt und erneut gewaschen. Eine Hämalunlösung (nach Mayer) diente der Gegenfärbung der Zellkerne. Nach weiterem Waschen wurden die Nierenschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit xylolhaltigem Eindeckmedium (Histofluid, M. Fremdling) sowie Deckgläschen verschlossen.

Die morphometrische Quantifizierung der PAS–Reaktion nach Sepsis–Induktion bzw. LPS–Gabe erfolgte mit der AxioVision Rel. 4.6 Software von 10

gleich großen Arealen (0,035 mm²) im Kortex pro Maus bzw. Nierenschnitt. Die morphologischen Veränderungen der Niere wurden im Doppelblindverfahren ausgewertet und einem Score von 0 bis 5 (0=100% bis 5=1% PAS-positiv) zugewiesen (Adnet et al. 1972, Doi et al. 2009b). Die Analyse erfolgte im Vergleich zu den Wildtyptieren und den entsprechenden Kontrolltieren.

3.3.2 Analyse von apoptotischen Gewebeschäden der Niere via TUNEL und aktiver Caspase 3

Der TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)–Assay und die immunhistochemische Reaktion zur Identifizierung der aktiven Caspase 3 (*cysteinyl-aspartate specific protease*) wurden durchgeführt, um die apoptotischen Veränderungen im kortikalen Nierengewebe 24h nach CLP-, PCI- und LPS-Behandlung zu detektieren und zu quantifizieren (Hughes und Gobe 2007). Für den TUNEL–Assay (*In Situ Cell Death Detection Kit*, POD; Roche) wurden in Paraffin eingebettete Nierenschnitte (5 µm) verwendet.

Der TUNEL–Assay beruht auf einer enzymatischen Reaktion, bei der Nukleotidtriphosphate an freie 3'–OH–Enden doppel- oder einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (DNS) binden. Unter apoptotischen Vorgängen fragmentieren Endonukleasen den nukleären DNS–Strang, sodass solche Hydroxylgruppen (3'–OH–Gruppen) freiwerden. Das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) vermittelt die Markierung dieser Bruchenden mit Biotin gekoppelten Nukleotiden, welche sichtbar gemacht werden können. Die Detektion der markierten Nukleinsäure erfolgt über eine Meerrettichperoxidase, die den Farbumschlag eines Chromogens katalysiert.

Der TUNEL–Assay wurde nach dem Protokoll von Roche durchgeführt. Die in Paraffin eingebettete Nierenschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Nach der Demaskierung via Mikrowelle (600 Watt, 4x5 min) in einem Citratpuffer (pH 6,1; Dako) und anschließendem Waschen erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen durch TritonX–100 (0,1%) in Citratpuffer. Danach wurden die gewaschenen Nierenschnitte mit einem Blockierungspuffer inkubiert. Im Anschluss wurde erneut gewaschen und die Schnitte mit der entsprechenden TUNEL–Reaktionslösung mit TdT und biotinyliertes Digoxigenin gekoppeltes Uridintriphosphat

(dUTP) in einer abgedunkelten und feuchten Kammer bei 37°C behandelt. Der Wasch- und der Blockierungsschritt wurden wiederholt und die Nierenschnitte mit Konverter-POD (Peroxidase) inkubiert. Zur Visualisierung wurde das Chromogen AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, VectorLab) verwendet. Schließlich wurden die gewaschenen Nierenschnitte mit Kaiser's Glycerin Gelatine verschlossen. Eine Negativ- und Positivkontrolle wurde parallel dazu durchgeführt. Für die Auswertung der apoptotischen Vorgänge wurde die Intensität der Färbung der Nuklei der vier Mausgruppen mit der AxioVision Rel. 4,6 Software ermittelt. Da das TUNEL-positive Ergebnis bzw. die Farbintensität mit der Schädigung der DNS korreliert, konnten mit der Software ImageJ das Ausmaß der Apoptose analysiert werden. Dabei wurden je 10 tubuläre Nuklei im Kortex der Mausniere gemessen und die Grauwerte als Farbintensität dargestellt. Die Bewertung erfolgte im Vergleich zu den Wildtyp- und den Kontrolltieren.

Blockierungspuffer:

- 3% BSA (Bovines Serum-Albumin, Roth) versetzt mit 20% FCS (*foetal calf serum*, PANTM Biotech) und Tris-HCl (pH 7,5)

Der zweite Nachweis apoptotischer Vorgänge nach einer Sepsis-Induktion bzw. LPS-Gabe erfolgte durch die immunhistochemische Analyse (IHC) von aktiver Caspase 3. Die Caspase 3 ist eine Effektorcaspase, die als zentrales Enzym sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg berücksichtigt. Diese Caspase leitet u. a. die Spaltung der nukleären DNS durch eine Nuklease ein.

Das Protokoll ist unter Pkt. 3.3.3 näher beschrieben.

3.3.3 Immunhistologischer Nachweis von Proteinen im Nierengewebe

Für den Nachweis der Proteine wurden durch Immunhistochemie zunächst die Proteine MORG1, HIF-1 α und HIF-2 α nachgewiesen. Damit konnte der Einfluss der Reduktion von MORG1 auf die Expression von HIF-1 α und HIF-2 α im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden. Zusätzlich wurden der

Bindungspartner PHD3 und Parameter der Apoptose und Inflammation analysiert. Die Färbung erfolgte an in Paraffin eingebetteten Nierenschnitten.

In dieser Arbeit wurde die indirekte immunhistochemische Methode verwendet.

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung in einer abfallenden Alkoholreihe wurden die in Paraffin eingebetteten Nierenschnitte (4 µm) in einem Citratpuffer (pH 6,1; Dako) in der Mikrowelle (600 Watt, 4x5 min) gekocht, um die Epitope freizulegen. Anschließend wurden die Nierenschnitte mit normalem Ziegenserum von VectorLab blockiert und mit einem spezifischen Primärantikörper (abcam) über Nacht bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde ein mit dem Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelter Sekundärantikörper aufgetragen. Im letzten Schritt wurde durch Wasserstoffperoxid (0,05% H₂O₂-Lösung), als Substrat der HRP, eine Reaktion ausgelöst. Dabei wurde das Chromogen AEC oxidiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software AxioVision Rel. 4,6. Die Intensität und Lokalisation der Färbung wurde im Doppelblindverfahren an 10 gleich großen Arealen von 0,0086 mm² pro Nierenschnitt bzw. Versuchstier ermittelt. Die Farbintensität und -lokalisation des untersuchten Proteins im Kortex der Mausniere wurde von 0=keine bis 5=starke Akkumulation klassifiziert. Die Auswertung der IHC der aktiven Caspase 3 wurde durch Auszählung der Spots pro Areal erhalten. Die Bewertung erfolgte im Vergleich zu den Wildtyp- und den entsprechenden Kontrolltieren. Um unspezifische Färbungen auszuschließen, wurden eine negative Kontrolle (Blockpuffer anstelle des Primärantikörpers) und eine Isotyp-Kontroll-Färbung mit einem IgG-Antikörper (unspezifisch, als Primärantikörper, normales Kaninchen IgG, sc-3888, nicht konjugiert, Santa Cruz Biotechnology) mitgeführt.

Primärantikörper:

- anti MORG1 (Kaninchen, Biotrend; 1:1000)
- anti HIF-1α (Kaninchen, abcam; 1:100)
- anti HIF-2α (Kaninchen, abcam; 1:100)
- anti PHD3 (Kaninchen, SantaCruz; 1:50)

- anti aktive Caspase 3 (Kaninchen, abcam, 1:50)
- anti CD3⁺-Komplex (Kaninchen, Dako, 1:75)
- anti TNF α (Kaninchen, abcam; 1:100)

Sekundärantikörper:

- HRP, gekoppelter Ziege gegen Kaninchen IgG (KPL, 1:500)

Chromogen:

- AEC (ImmPact™, AEC Peroxidase Substrate Kit, VectorLab)

3.4 Molekularbiologische Analyse

3.4.1 Isolation der RNS und reverse Transkription

Für die Analyse der Expression der mRNA wurden die Gene *Morg1*, *Hif-1 α* , *Hif-2 α* und der Bindungspartner von MORG1 *Phd3* sowie Zielgene von HIF wie *Epo*, *Glut1* (Glucosetransporter Typ 1) und *Tnfa* im Gesamtnierengewebe analysiert. Damit wurde die Auswirkung der MORG1-Heterozygotie auf die CLP- und LPS-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp auf Genebene untersucht.

Die RNS des Nierengewebes wurde nach Herstellerangaben des Qiagen RNeasy Mini Kits von Qiagen isoliert. Für die Analyse der Expression der mRNA von *Tnfa* im Vollblut wurde die Gesamt-mRNA mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit von Qiagen isoliert.

Die isolierte RNS wurde in einer reversen Transkription zu einer komplementären DNS (cDNS) umgeschrieben (M-MLV reverse Transkriptionssystem, Invitrogen).

3.4.2 Real time PCR

Via dem Light Cycler SYBR Green I Kit von Roche und dem Mastercycler ep von Eppendorf wurde die cDNS in einer *real time* PCR (*polymerase chain reaction*) amplifiziert und semiquantitativ analysiert (siehe **Tab. 4**).

Tabelle 4: Real time PCR–Programm. T_{ann} , Temperatur der Primerhybridisierung.

Initiale De-naturation	De-naturation	T_{ann}	Extension	Finale Extension			
95°C	95°C	s. u.	72°C	95°C	65°C	δ	95°C
10 min	30 s	30 s	40 s	15 s	15 s	10 min	15 s
1 Zyklus	----- 40 Zyklen -----			1 Zyklus			

Die dabei entstandenen Echtzeit–Daten (C_t) wurden über die Software realplex 2.2 (Eppendorf) ausgegeben. Zur Bestimmung der Expressionsstärke der Zielgen–mRNS wurde die $\Delta\Delta C_T$ –Methode nach Livak und Schmittgen verwendet (Livak und Schmittgen 2001). Dabei wurde eine Effizienz von 2 unterstellt (siehe **Gleichung 1**).

$$Ratio = 2^{-[\Delta C_{T_{Probe}} - \Delta C_{T_{Kontrolle}}]} \quad (1)$$

In Relation zu der 18S ribosomalen RNS als Referenzgen (bei *Tnfa* aus Vollblut: Referenzgen *Hprt*, Hypoxanthin–Guanin–Phosphoribosyltransferase) wurden die ΔC_T –Werte quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte durch die sham–CLP bzw. NaCl behandelte Kontroll–Wildtyp.

Primerpaar für *Morg1* (T_{ann} 58°C, Invitrogen):

- sense 5'–CCTATCACCTGCACCTGCTT–3'
- antisense 5'–CACTTTCCCGTCTTCAGAGC–3'

Primerpaar für *Hif–1α* (T_{ann} 58°C, Invitrogen):

- sense 5'–TGAGCTTGCTCATCAGTTGCCAC–3'
- antisense 5'–TGTCCAGTTAGTTCAAACCTGAGTTAACC–3'

Primerpaar für *Hif–2α* (T_{ann} 58°C, Invitrogen):

- sense 5'–AAGCTCCTGTCCTCAGTCTG–3'
- antisense 5'–CATCCTCATGAAGAAGTCAC–3'

Primerpaar für *Phd3* (T_{ann} 58°C, Invitrogen):

- sense 5'–GCTATCCAGGAAATGGGACA–3'
- antisense 5'–GGCTGGACTTCATGTGGATT–3'

Primerpaar für *Epo* (T_{ann} 56°C, Invitrogen):

- sense 5'–GAGCAAATGAGGAAGGTCCA–3'
- antisense 5'–AGGCCCTGGTAGAGGAAGAG–3'

Primerpaar für *Glut1* (T_{ann} 58°C, Invitrogen):

- sense 5'–ACATGGAACCAACCGCTACG–3'
- antisense 5'–AGTTCCGCCTGCCAAAG–3'

Primerpaar für *18S* (T_{ann} 60°C, TIB MOLBIOL):

- sense 5'–CACGGCCGGTACAGTGAAAC–3'
- antisense 5'–GATCTGATAAATGCACGC–3'

Primerpaar für *Tnfa* (T_{ann} 58°C, Invitrogen):

- sense 5'–GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC–3'
- antisense 5'–ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCCGG–3'

Primerpaar für *Hprt* (T_{ann} 59°C, Invitrogen):

- sense 5'–ATCAGTCAACGGGGGACATA–3'
- antisense 5'–AGAGGTCCTTTTCACCAGCA–3'

3.4.3 Untersuchung der Expression von Proteinen mit ELISA

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist eine sehr sensitive und spezifische Methode und beruht auf dem Prinzip einer Antigen–Antikörper–Reaktion. Das allgemeine Testprinzip ist die Bindung eines immobilisierten Antikörpers mit dem zu untersuchenden Epitop (Zielprotein) in der Probe. Über die Konjugation von dem Enzym gekoppelten Antikörper mit einem Chromogen–Substrat kann die Intensität des Farbumschlags, d. h. die Enzymaktivität photometrisch gemessen werden. Dabei ist die erfasste Intensität proportional zur Menge des spezifisch gebundenen Epitops. Die Konzentration kann dann mit einer Standardkurve bestimmt werden.

Die folgenden Proteine wurden mit ELISA quantitativ bestimmt:

- VEGF (*vascular endothelial growth factor*) im Blutplasma mit dem ELISA der Firma Signosis; Absorption bei 450 nm

- NGAL (*neutrophil gelatinase–associated lipocalin*) im Blutplasma mit dem ELISA von BioPorto; Absorption bei 450 nm, Referenzmessung bei 650 nm und
- Albumin im Urin mit dem ELISA von CellTrend; Absorption bei 450 nm.

Die Proben für den jeweiligen ELISA wurden auf Eis aufgetaut und nach dem Protokoll des Herstellers analysiert. Die spektroskopische Messung erfolgte mit einem Gerät von Tecan (infinite M200). Durch das Mitführen eines Standards konnte über eine Standardkurve die jeweiligen Konzentrationen errechnet werden. Die Analyse erfolgte im Vergleich zu den Wildtyp– und entsprechenden Kontrolltieren.

3.4.4 Detektion von Zytokinen durch CBA

Der CBA ist ein *cytometric bead array* (CBA, Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, BD Biosciences) auf der Basis eines *bead* gekoppeltem ELISA, mit dem Interleukine im Blutplasma detektiert werden können. Das Prinzip beruht auf einer Antigen–Antikörper–Reaktion. Die Menge der Interleukine wird mit FACS (*fluorescence–activated cell sorting*) gemessen. Jedes *capture–bead* ist konjugiert mit einem spezifischen Antikörper gegen ein Interleukin. Die Detektionsreagenz emittiert ein Fluoreszenzsignal in Proportion zum Gehalt der gebundenen Analyte in der Blutplasmaprobe.

Die Proben für die Analyse der Zytokine IL–6, IL–10 und INF γ (Interferon *gamma*) im Blutplasma via CBA wurden auf Eis aufgetaut und lt. Hersteller–Protokoll analysiert. Anhand der mitgeführten Standardreihe konnten die Konzentrationen errechnet und im Vergleich zu den Wildtyp– und den entsprechenden Kontrolltieren analysiert werden.

3.4.5 Analyse zur Nierenfunktion durch den kolorimetrischen Assay im Blutplasma und im Urin

Ein akutes Nierenversagen geht mit einer Tubulusnekrose einher und resultiert in der Freisetzung von Proteinen aus Tubuluszellen (Coca et al. 2008). In der klinischen Medizin werden daher u. a. die klassischen Parameter Kreatinin und Blut–Harnstoff–Stickstoff (BUN) bestimmt.

Das Messprinzip beruht auf einer optischen Reflexionsmessung. Über die enzymatische Umsetzung des Substrates in der Probe wird dann der Umschlag eines Farbstoffs photometrisch gemessen.

Die Bewertung der Nierenfunktion anhand der Parameter Kreatinin und BUN erfolgte an Blutplasmaproben nach der CLP-, PCI- und LPS-Behandlung mit einer Enzym basierten, kolorimetrischen Methode von FUJIFILM (FUJI DRI-CHEM 3500i). Die Probe wurde auf einen Chip (fuji slides, Sysmex) aus multigelagerten Analysemembranen gegeben. Das Messgerät (FUJI DRI-CHEM 3500i) übertrug die Messergebnisse in die vorinstallierte Kalibrierungskurve. Die Konzentrationen von Kreatinin und BUN in den Plasmaproben wurden mit den Wildtyp- und entsprechenden Kontrolltieren verglichen.

Um die Nierenfunktion über den Parameter Albumin/Kreatinin-Ratio (ACR) zu analysieren, wurden die Konzentrationen der beiden Substanzen im Urin bestimmt. Der Quotient von Albumin und Kreatinin ist ein Zeichen der Nierenschädigung hinsichtlich der Ultrafiltrationsbarriere und gibt eine Tendenz in Bezug auf die Nierenfunktion. Dazu wurde die Konzentration von Albumin via ELISA (siehe Pkt. 3.4.3) und Kreatinin mit einem enzymatisch-kolorimetrischen Assay unter Verwendung eines Kits von Cayman Chemical ermittelt.

Diese Messmethode unterliegt der Jaffe'-Indikatorreaktion mit alkalischer Pikratlösung, mit der die Konzentration von Kreatinin im Urin gemessen werden kann.

Die Proben für die Analyse von Harn-Kreatinin wurden auf Eis aufgetaut und lt. Hersteller-Protokoll analysiert. Die Messung der Absorption erfolgte mit einem Photometer von Tecan bei 495 nm. Mit der generierten Standardkurve wurde die Konzentration berechnet und im Verhältnis zu dem Harn-Albumin gesetzt. Die Ratio wurde im Vergleich zu den Wildtyp- und den entsprechenden Kontrolltieren analysiert.

3.5 Statistik

Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Softwarepaket von SigmaPlot (Version 12.0, Systat Software) für Windows durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt von dem Mann-

Whitney U-Test analysiert und als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*) in den Balkendiagrammen bzw. als Median in den Boxplots angegeben.

Die Überlebenszeitanalyse wurde durch die Kaplan-Meier-Methode ausgewertet und als Kaplan-Meier-Kurve angegeben.

Unterschiede wurden als signifikant anerkannt bei $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 CSS Analyse in *Morg1^{+/-}*– im Vergleich zu Wildtypmäusen

Die Induktion von Sepsis durch die Mausmodelle CLP und PCI sowie die Applikation von LPS wurden in Wildtyp– und *Morg1^{+/-}*–Mäusen durchgeführt.

Innerhalb der Behandlungszeit von 24h wurde für CLP (**Abb. 5A**), PCI (**Abb. 5B**) und LPS (**Abb. 5C**) das äußere Erscheinungsbild (CSS) aller Versuchstiere beurteilt, um die Krankheitsschwere abzuleiten.

Die subjektive Einschätzung korrelierte zumeist mit den für diese Arbeit gemessenen Parametern. Im Vergleich zu den sham–CLP operierten Tieren blieben das Aussehen, das Verhalten und die Positur der NaCl behandelten Versuchstiere beider Maus–Genotypen über den Versuchszeitraum unverändert. Nach der sham–CLP–OP waren das Verhalten und Positur der sham–CLP–Tiere nach 6h signifikant ($p < 0,01$) für beide Genotypen verschlechtert. Nach den Behandlungen CLP, PCI sowie LPS wurde in beiden Genotypen eine signifikante Verschlechterung des äußeren Erscheinungsbilds der Mäuse ermittelt. Ein auffälliges Krankheitsbild fand sich nach 6h und 24h (Wildtyp $p < 0,01$; *Morg1^{+/-}* $p < 0,05$). Dabei konnte eine zeitabhängige Verschlechterung der Verfassung der Versuchstiere nach der Sepsis–Induktion bzw. LPS–Injektion beobachtet werden. Zum Zeitpunkt 24h nach CLP– und PCI–Behandlung wurde eine tendenziell verbesserte Verfassung der *Morg1^{+/-}*–Tieren im Vergleich zu den Wildtypmäusen beobachtet. Diese Befunde konnten in dem LPS–Modell nicht beobachtet werden.

Zudem wurde eine evidente Induktion einer Sepsis durch Blutabstrich und Fotodokumentation belegt. In einigen septischen Versuchstieren wurden durch Blutkultur Pathogene gefunden (nicht gezeigt). Allerdings konnten nicht in jedern Blutprobe, wie das auch in humanen Blutabstrichen der Fall ist (Riedemann et al. 2003), Mikroorganismen nachgewiesen werden. Auch **Abbildung 4** (Pkt. 3.2.3) einer septischen Maus zeigt deutlich eine hervorgerufene Peritonitis mit erkennbaren Gewebeveränderungen an Organen wie Kolon und Leber.

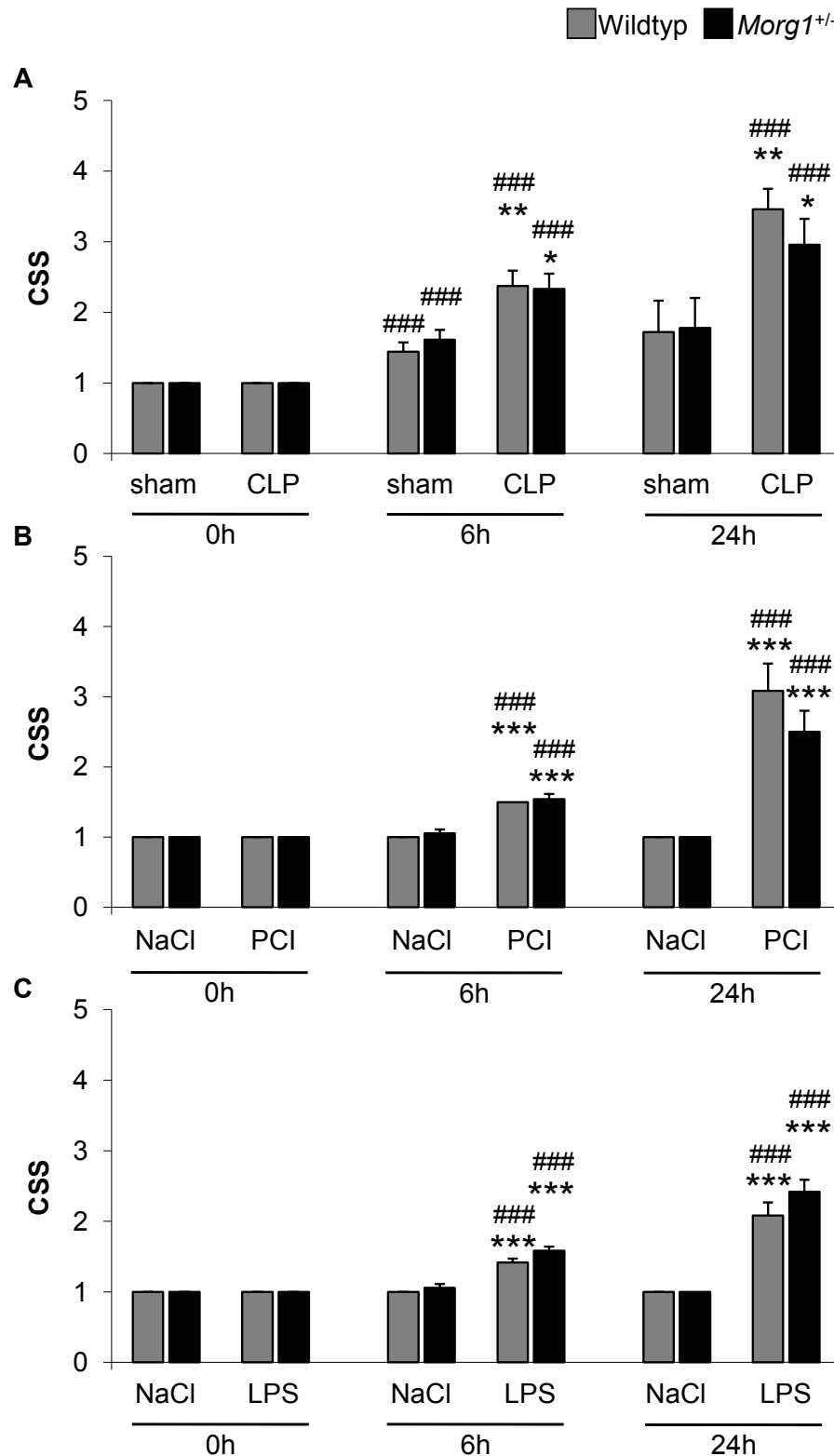


Abbildung 5: Beurteilung des äußeren Erscheinungsbilds via CSS. Der CSS wurde 0h, 6h und 24h nach den Behandlungen (A) CLP, (B) PCI und (C) LPS durchgeführt und als Mittelwert (MW) \pm SEM dargestellt. $n_{\text{sham-CLP/NaCl}}=9$; $n_{\text{CLP,PCI,LPS}}=12$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ sham-CLP/NaCl versus CLP/PCI/LPS und im Vergleich zu einem Zeitpunkt; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ gleiche Behandlungen bei 6h bzw. 24h im Vergleich zu 0h.

Das äußere Erscheinungsbild und die Verfassung der Versuchstiere nach der Sepsis-Induktion bzw. LPS-Injektion war innerhalb der Behandlungszeit von 24h zeitabhängig verschlechtert.

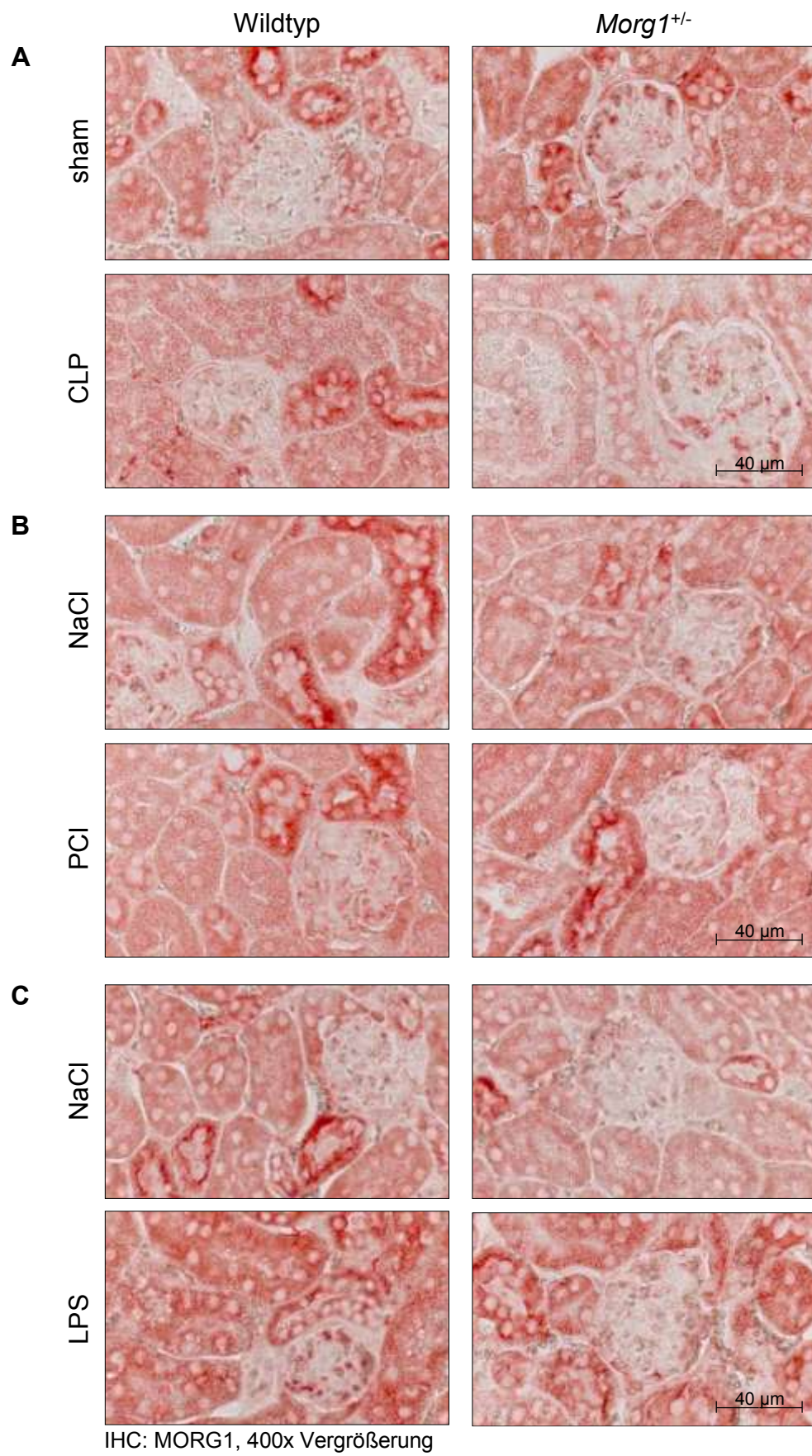
4.2 Analyse von MORG1 und HIF-1 α sowie involvierte Proteine wie HIF-2 α , PHD3, EPO, GLUT1 und VEGF nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Gabe

Die Analysen von MORG1 und dessen Bindungspartner PHD3 sowie deren Assoziationsproteine HIF-1 α und HIF-2 α wurden 24h nach Sepsis-Induktion durch CLP und PCI oder LPS-Gabe in Wildtyp- und *Morg1*^{+/-}-Mäusen durchgeführt. Hierzu wurde die Protein- und mRNA-Expression durch IHC an in Paraffin eingebetteten Nierengewebeschnitten bzw. mit *real time* PCR in der Gesamtnierengewebe-RNS analysiert.

4.2.1 Expression von MORG1

Die immunhistochemische Analyse der Protein-Expression von MORG1 im kortikalen Bereich der Mausniere 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS ist in der **Abbildung 6** dargestellt.

Im CLP-Modell (**Abb. 6A**) stieg der basale Protein-Level von MORG1 in den Nieren der sham-CLP operierten *Morg1*^{+/-}-Mäusen über das von Wildtyptieren. Im Gegensatz dazu war im PCI- und LPS-Modell (**Abb. 6B** und **6C**) der basale Level von MORG1 in dem renalen Kortex der NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen geringer im Vergleich zu den NaCl behandelten Wildtypmäusen. Nach der CLP-OP nahm die MORG1-Expression in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen im kortikalen Nierenbereich signifikant ($p < 0,05$) ab. Der Protein-Level in den behandelten Wildtypmäusen blieb dabei unverändert. Die PCI-Induktion führte im Nierengewebe der Wildtypmäuse zu einer Verringerung vom MORG1-Protein. In den mit PCI behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen stieg die Protein-Expression von MORG1, wohingegen die Akkumulation von MORG1-Protein in beiden Genotypen nicht differierte. Nach der LPS-Gabe nahm der Protein-Level von MORG1 in beiden Genotypen zu, wobei die Expression von MORG1 in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen geringer war verglichen mit den Wildtypmäusen.



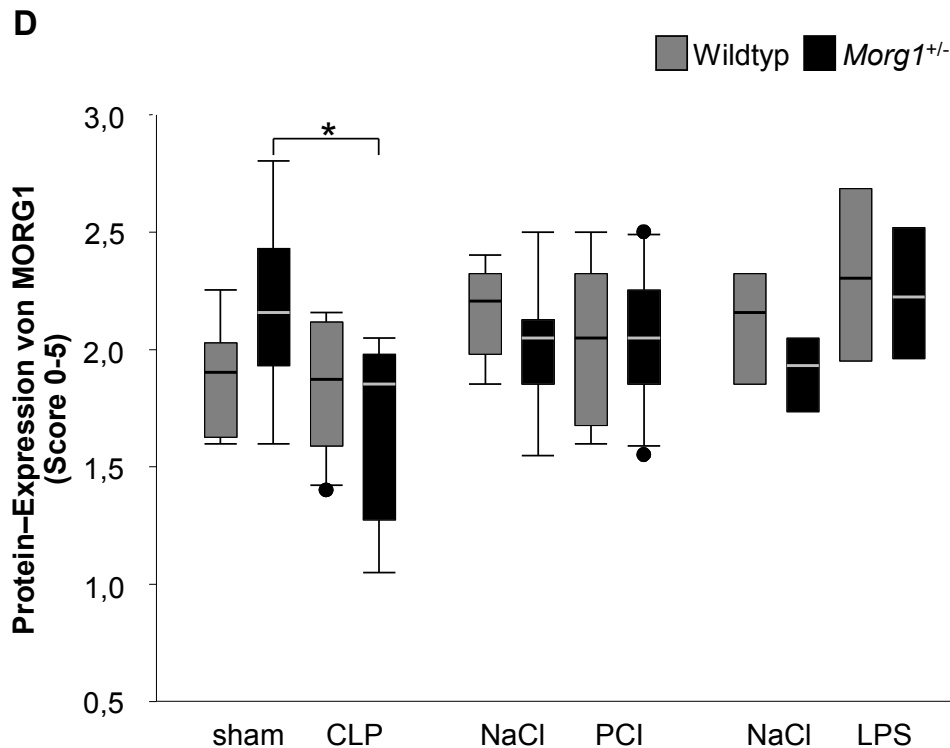


Abbildung 6: Analyse der Protein-Expression von MORG1 im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen. Die MORG1-Expression wurde durch IHC und Quantifizierung mit Hilfe eines Scores (0-5) analysiert. (A-C) Repräsentative Bilder der Nierenschnitte nach den Behandlungen (A) CLP, (B) PCI und (C) LPS. Vergrößerung: 400x. (D) Die relative Protein-Expression von MORG1 ist als MW \pm SEM dargestellt. $n_{CLP}=9/9/10/9$; $n_{PCI}=9/9/9/11$; $n_{LPS}=6/6/8/8$. * $p<0,05$ sham-CLP versus CLP.

Die **Abbildung 7** zeigt die mRNA-Expression von *Morg1* im Gesamtnierengewebe 24h nach Sepsis-Induktion via CLP und PCI sowie LPS-Gabe. Die *Morg1*-mRNA-Expression ist in n-fach angegeben und normalisiert gegen die Referenz und den Kontroll-Wildtyp.

In den sham-CLP operierten und den NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mausnieren war die mRNA-Expression von *Morg1* signifikant geringer im Vergleich zu den unbehandelten Wildtypmännchen der drei Modelle CLP ($p<0,01$), PCI ($p<0,001$) und LPS ($p<0,001$). Zudem konnte eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression von *Morg1* in den Wildtypmäusen nach der sham-CLP-OP ($p<0,05$), verglichen mit den NaCl behandelten Wildtypmännchen, beobachtet werden. Der Level der *Morg1*-mRNA-Expression in *Morg1*^{+/-}-Mausnieren war auf einem signifikant erniedrigten Niveau in sham-CLP operierten ($p<0,01$) und NaCl behandelten Tieren ($p<0,001$). Die sham-CLP-OP bewirkte eine

signifikante Verminderung der *Morg1*-mRNS ($p < 0,01$) im Gesamtnierengewebe (kleines Diagramm in **Abb. 7**). Nach den Behandlungen CLP ($p < 0,05$) und LPS ($p < 0,05$) sank die mRNS-Expression von *Morg1* in den Nieren der Wildtypen signifikant, aber blieb in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen unverändert im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren. Diese Ergebnisse sind im PCI-Modell nicht zu sehen. Zudem war die mRNS-Expression von *Morg1* signifikant geringer in *Morg1*^{+/-}-Tieren verglichen mit den Wildtypmäusen nach den Behandlungen PCI ($p < 0,05$) und LPS ($p < 0,001$).

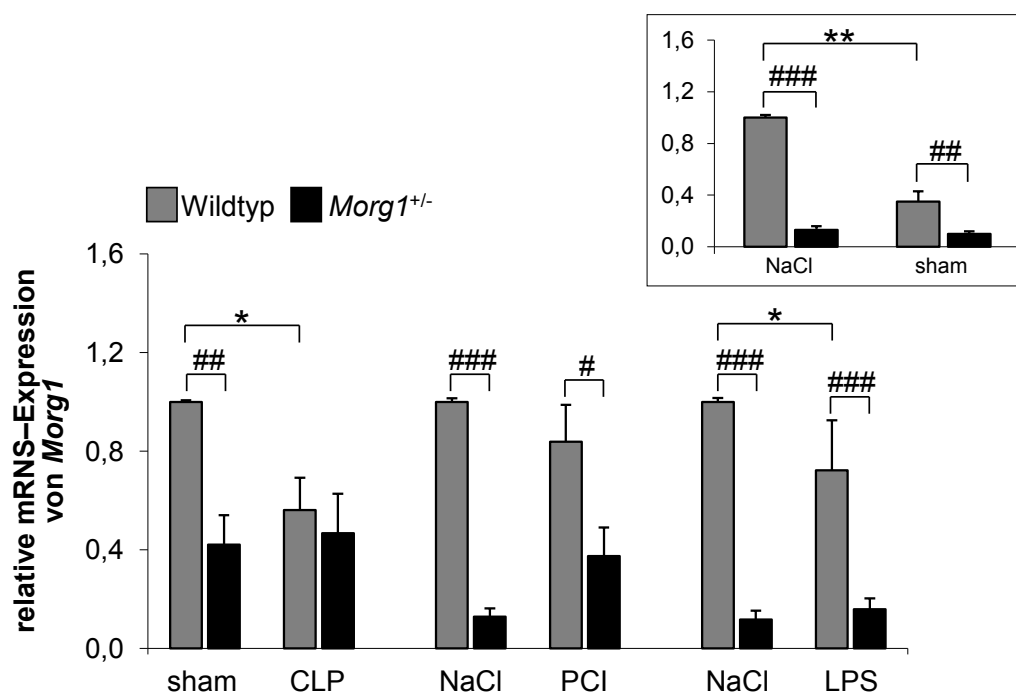


Abbildung 7: Analyse der mRNS-Expression von *Morg1* via *real time* PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS. Die *Morg1*-Expression ist als MW \pm SEM dargestellt. Für jede Behandlung sind die Daten in Relation zum Referenzgen und zum Kontroll-Wildtyp präsentiert. $n_{CLP}=7/9/11/9$; $n_{PCI}=9/8/9/12$; $n_{LPS}=9/8/10/12$. * $p < 0,05$ sham-CLP/NaCl versus CLP/LPS; ** $p < 0,01$ NaCl versus sham-CLP; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ Wildtyp versus *Morg1*^{+/-}.

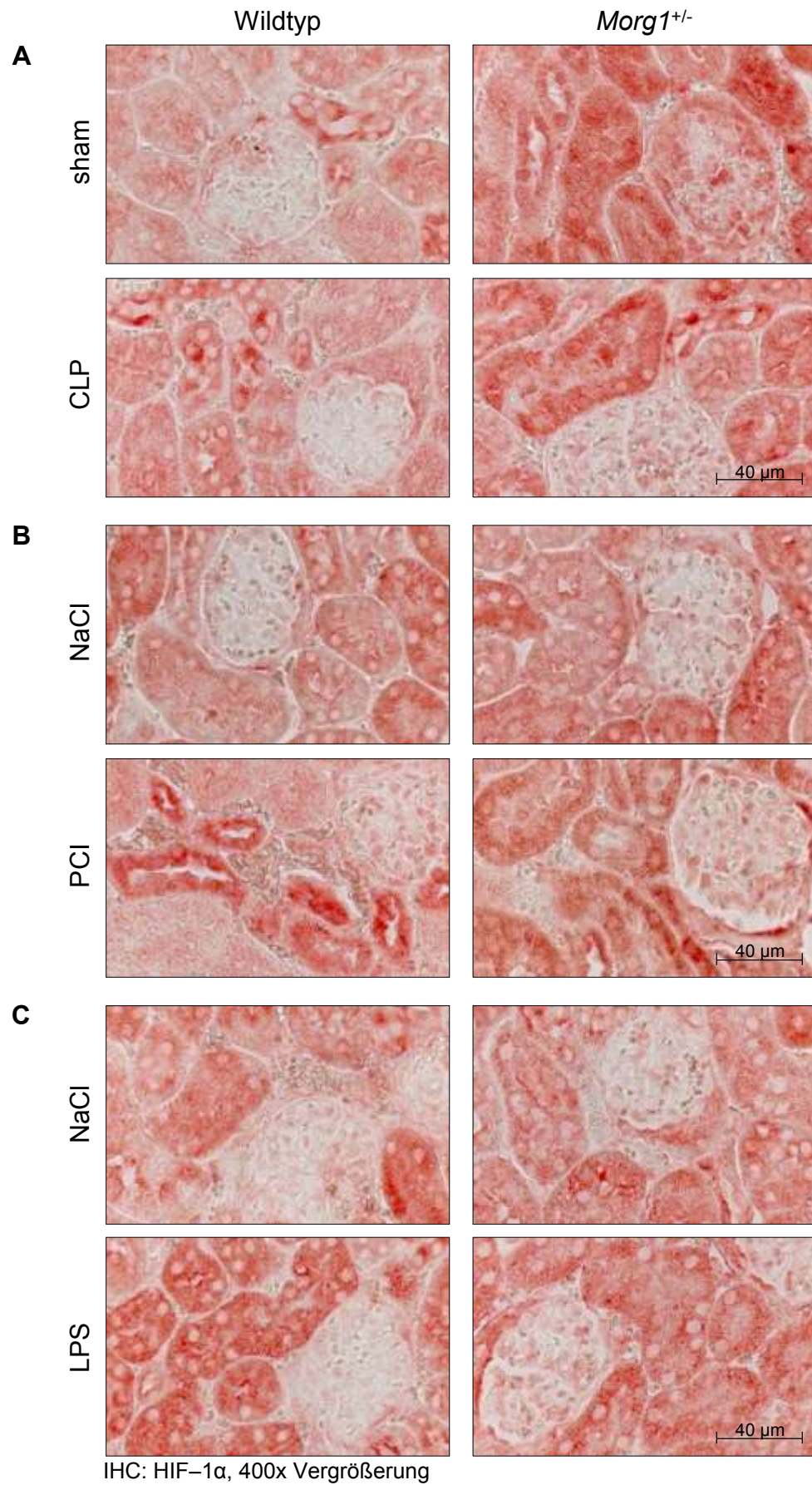
Die mRNS-Expression von *Morg1* war in den Nieren der *Morg1*^{+/-}-Mäuse signifikant geringer im Vergleich zu den Wildtyptieren nach Sepsis-Induktion und LPS-Gabe. Die Behandlungen führten zu einer Verringerung die Expression von *Morg1* in den Wildtyptieren, aber nicht in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen. Demgegenüber zeigte die Analyse der Protein-Expression von MORG1 sehr

unterschiedliche Expressionsmuster im Nierengewebe nach den verschiedenen Behandlungen.

4.2.2 Expression von HIF-1 α

Die Rolle von HIF-1 α als Transkriptionsfaktor sollte in der Sepsis induzierten Nierenschädigung analysiert werden. Dazu wurden bei der Analyse der IHC gefärbten Nierenschnitte die zytoplasmatische sowie die Kernfärbung einbezogen. In der **Abbildung 8** ist die immunhistochemische Auswertung der Protein-Expression von HIF-1 α im Nierenrindenbereich der Mäuse 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS gezeigt.

Die basale Protein-Expression von HIF-1 α war im Nierenkortex der sham-CLP operierten *Morg1*^{+/-}-Mäuse höher verglichen mit den Wildtypmäusen im CLP-Modell (**Abb. 8A**) sowie im Vergleich mit den NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}- und Wildtypmäusen. Deutlich ist die starke Kernfärbung in den Nierenschnitten der *Morg1*^{+/-}-Mäuse aufgrund der sham-CLP-OP zu sehen im Gegensatz zu den NaCl behandelten Tieren beider Maus-Genotypen. Dazu war im PCI- und LPS-Modell (**Abb. 6B** und **6C**) der basale Level von HIF-1 α in den NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen im arithmetischen Mittel gleich zu den unbehandelten Wildtypmäusen, jedoch lag der Median der Analysedaten bei den NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäuse höher verglichen mit den Wildtyptieren. Nach der CLP-OP konnte keine Veränderung der Expression von HIF-1 α in den Nieren der Wildtyp- sowie der *Morg1*^{+/-}-Mäuse detektiert werden verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren. Der Protein-Level von HIF-1 α war jedoch im renalen Kortex der behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäuse signifikant höher ($p < 0,05$) verglichen mit den behandelten Wildtypmäusen nach CLP-OP. Die PCI-Behandlung führte in den Wildtypmäusen zu einer Erhöhung der Protein-Expression von HIF-1 α in dem Zytoplasma und den Nuklei der Tubuli im Nierenkortex. In den *Morg1*^{+/-}-Mäusen konnte keine Zunahme im Zytoplasma, aber eine gesteigerte nukleäre Expression von HIF-1 α nach der PCI-Behandlung gezeigt werden. Die PCI vermittelte HIF-1 α -Expression war nach 24h in den Nieren beider Maus-Genotypen auf gleichem Niveau, wobei die Expression in den Wildtyptieren wesentlich anstieg.



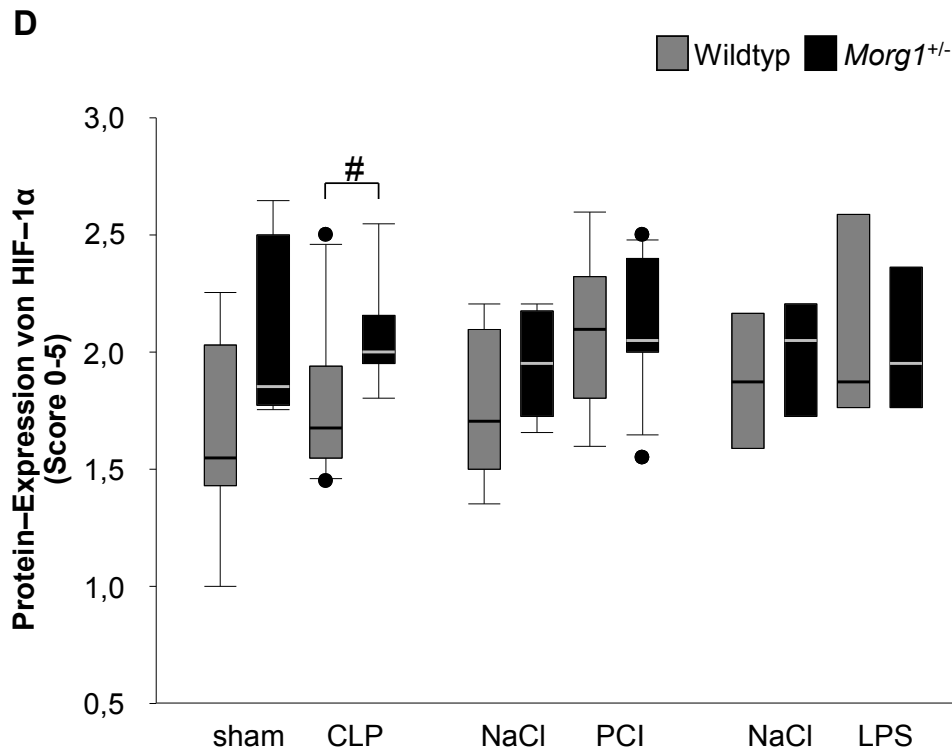


Abbildung 8: Analyse der Protein-Expression von HIF-1α im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen. Die HIF-1α-Expression wurde durch IHC und Quantifizierung mit Hilfe eines Scores (0-5) analysiert. (A-C) Repräsentative Bilder der Nierenschnitte nach den Behandlungen (A) CLP, (B) PCI und (C) LPS. Vergrößerung: 400x. (D) Die relative Protein-Expression von HIF-1α ist als MW ± SEM dargestellt. $n_{CLP}=9/9/10/9$; $n_{PCI}=9/9/9/11$; $n_{LPS}=6/6/8/8$. # $p<0,05$ Wildtyp versus *Morg1*^{+/-}.

Nach der LPS-Gabe war der Protein-Level von HIF-1α in beiden Genotypen im Zytoplasma der Nierentubuli gestiegen, wenn das arithmetische Mittel betrachtet wurde. Dabei war HIF-1α in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen geringer exprimiert verglichen mit den Wildtypmäusen. Eine tubuläre Kernfärbung konnte in beiden Genotypen nach LPS-Applikation nicht detektiert werden.

Zusätzlich zur Protein-Expression von HIF-1α wurde auch der mRNS-Level von *Hif-1α* im Gesamtnierengewebe 24h nach CLP-, PCI- sowie LPS-Behandlung analysiert.

In den sham-CLP operierten *Morg1*^{+/-}-Mäusen war die *Hif-1α*-Expression tendenziell höher, aber in den NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen signifikant geringer ($p<0,05$) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (Abb. 9). Das kleine Diagramm in **Abbildung 9** zeigt den direkten Vergleich der mRNS-Expression von *Hif-1α* der sham-CLP operierten zu den NaCl behandelten Wildtyp- und

Morg1^{+/-}-Mausnieren. Es zeigte sich eine signifikant geringere *Hif-1α*-Expression in Wildtypmausnieren ($p < 0,05$) nach sham-CLP-OP im Gegensatz zu den NaCl behandelten des gleichen Genotyps. Demgegenüber war die Expression in den Mausnieren der sham-CLP operierten und den NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Tiere unverändert.

Nach der CLP-Induktion konnten keine Unterschiede in der mRNA-Expression von *Hif-1α* im Nierengewebe beider Genotypen detektiert werden im Vergleich zu den entsprechenden sham-CLP operierten Tieren. Allerdings war in den CLP behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen die *Hif-1α*-mRNA tendenziell höher exprimiert im Vergleich zu den CLP behandelten Wildtypmäusen. Nach der PCI- und LPS-Behandlung (**Abb. 9**) stieg tendenziell die *Hif-1α*-Expression in beiden Genotypen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren. Dabei war die gemessene Expression zwischen den PCI behandelten Wildtyp- und *Morg1*^{+/-}-Mäusen jedoch gleich hoch. Der Anstieg war allerdings in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen höher verglichen mit dem in den Wildtypnieren.

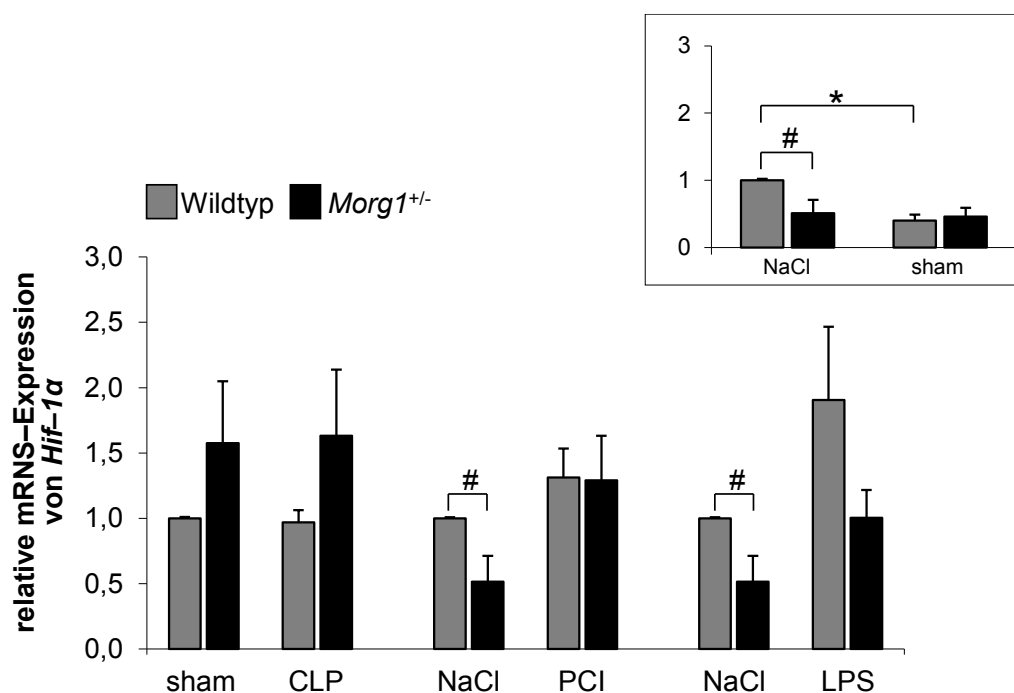


Abbildung 9: Analyse der mRNA-Expression von *Hif-1α* via *real time* PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS. Die *Hif-1α*-Expression ist als MW \pm SEM dargestellt. Für jede Behandlung sind die Daten in Relation zum Referenzgen und zum Kontroll-Wildtyp präsentiert. $n_{CLP}=7/9/11/9$; $n_{PCI}=9/8/9/12$; $n_{LPS}=9/8/10/12$. * $p < 0,05$ NaCl versus sham-CLP; # $p < 0,05$ Wildtyp versus *Morg1*^{+/-}.

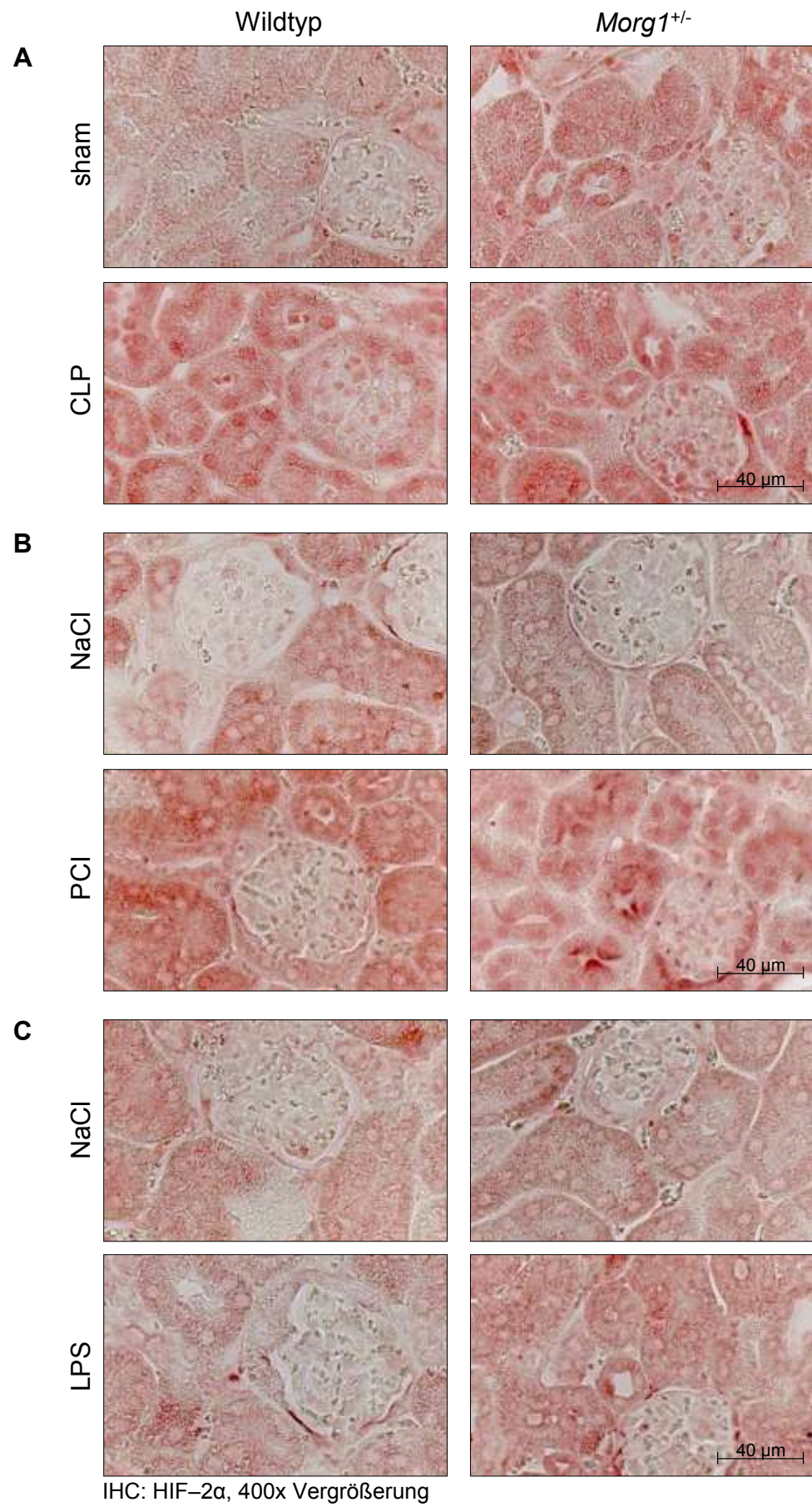
Nach der LPS-Injektion stieg in beiden Genotypen die mRNA-Expression von *Hif-1 α* tendenziell an, wobei der Anstieg der Expression bei beiden behandelten Genotypen ähnlich war. Dennoch war in den *Morg1^{+/-}*-Mausnieren die *Hif-1 α* -mRNA geringer exprimiert verglichen mit den Wildtypmäusen.

Die Analyse der renalen mRNA-Expression von *Hif-1 α* zeigte in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen eine signifikant geringere Expression verglichen mit den Wildtypnieren, wenn diese mit NaCl behandelt waren. Zudem waren die Behandlungen CLP, PCI und LPS mit der Expression von *Hif-1 α* -mRNA und des Proteins HIF-1 α im Nierengewebe beider Genotypen überwiegend positiv korreliert.

4.2.3 Expression von HIF-2 α

In der immunhistochemischen Analyse von HIF-2 α im Nierenkortex 24h nach Sepsis-Induktion durch CLP und PCI sowie der Gabe von LPS wurde die zytoplasmatische und nukleäre Färbung in den Tubuli analysiert.

Die basale Protein-Expression von HIF-2 α war im Zytoplasma und den Nuklei der tubulären Zellen der *Morg1^{+/-}*-Mäuse nach der sham-CLP-OP tendenziell höher ($p=0,052$) im Vergleich zu den Wildtypnieren. Zwischen den NaCl behandelten *Morg1^{+/-}*- und Wildtypnieren konnte kein Unterschied in der HIF-2 α -Expression gemessen werden. Die CLP-Behandlung führte zu einer tendenziellen Akkumulation von HIF-2 α im Zytoplasma und den Nuklei der Tubuli im Nierenkortex in den Wildtypnieren und zu einer signifikanten in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen ($p<0,05$). Im Vergleich der beiden Genotypen akkumulierte HIF-2 α in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen signifikant ($p<0,05$) und stärker als in Wildtypnieren. Eine PCI vermittelte Sepsis-Induktion erhöhte die HIF-2 α -Expression, wobei in den Tubuli des Nierenkortex der Wildtypnieren eine stärkere zytoplasmatische, aber schwächere nukleäre Färbung im Vergleich zu *Morg1^{+/-}*-Mäusen ($p<0,01$) zu detektieren war. Die LPS-Gabe führte zu keiner signifikanten Veränderung der Protein-Expression von HIF-2 α in beiden Maus-Genotypen.



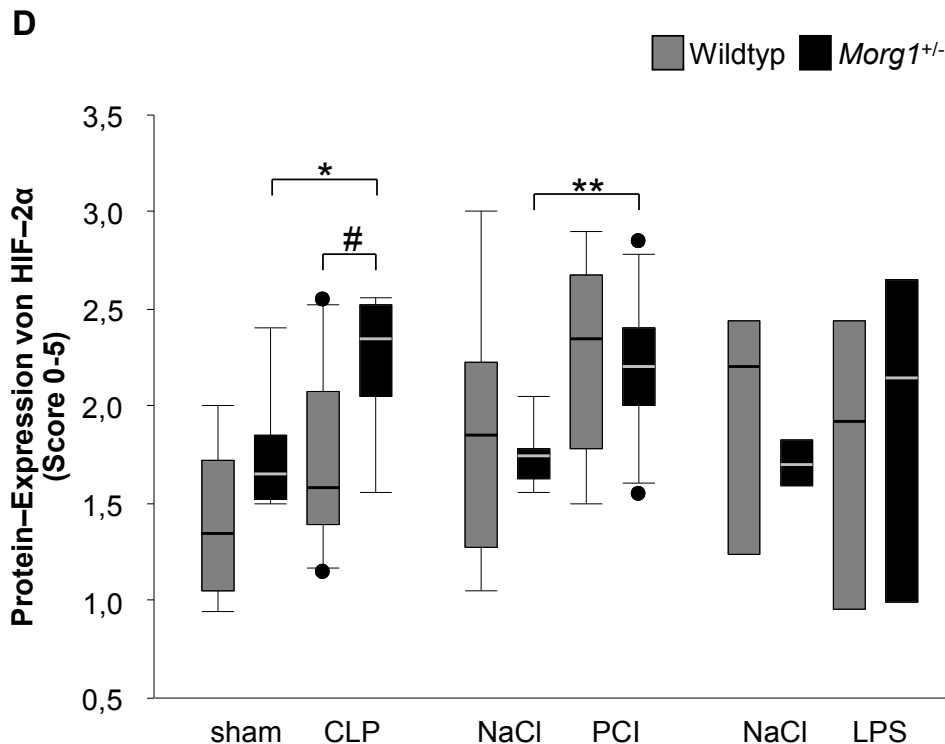


Abbildung 10: Analyse der Protein-Expression von HIF-2α im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen. Die HIF-2α-Expression wurde durch IHC und Quantifizierung mit Hilfe eines Scores (0-5) analysiert. (A-C) Repräsentative Bilder der Nierenschnitte nach den Behandlungen (A) CLP, (B) PCI und (C) LPS. Vergrößerung: 400x. (D) Die relative Protein-Expression von HIF-2α ist als MW ± SEM dargestellt. $n_{CLP}=9/9/10/9$; $n_{PCI}=9/9/9/11$; $n_{LPS}=6/6/8/8$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ sham-CLP/NaCl versus CLP/PCI; # $p<0,05$ Wildtyp versus *Morg1*^{+/-}.

Die **Abbildung 11** zeigt die mRNS-Expression von *Hif-2α* im Gesamtnierengewebe 24h nach CLP- und PCI-Behandlung sowie LPS-Applikation.

In den sham-CLP operierten Wildtyp- und *Morg1*^{+/-}-Mäusen konnte kein Unterschied in der basalen mRNS-Expression von *Hif-2α* detektiert werden. Im Gegensatz dazu war in NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen die mRNS-Expression von *Hif-2α* signifikant geringer ($p<0,05$) im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Wildtyptieren. In dem kleinen Diagramm in **Abbildung 11** ist die signifikant geringere *Hif-2α*-Expression in den Nieren der sham-CLP operierten Wildtyptiere zu sehen. Dies konnte für die *Morg1*^{+/-}-Mäuse nicht gezeigt werden.

Nach der CLP- und PCI-Behandlung sank die *Hif-2α*-Expression in der Wildtypniere (nach CLP signifikant mit $p<0,05$), aber stieg in den *Morg1*^{+/-}-

Mausnieren tendenziell an, verglichen mit den entsprechenden sham-CLP operierten bzw. NaCl behandelten Tieren. Dabei war die *Hif-2 α* -mRNS im Nierengewebe der CLP operierten *Morg1^{+/-}*-Mäuse höher exprimiert im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. In der *Hif-2 α* -Expression bei den PCI behandelten Mäusen war kein Unterschied zwischen den beiden Maus-Genotypen zu detektieren. Nach der LPS-Applikation stieg die mRNS-Expression von *Hif-2 α* in beiden Genotypen tendenziell im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren. Dabei war die gemessene *Hif-2 α* -Expression in den LPS behandelten Wildtyptieren höher verglichen mit den *Morg1^{+/-}*-Mäusen.

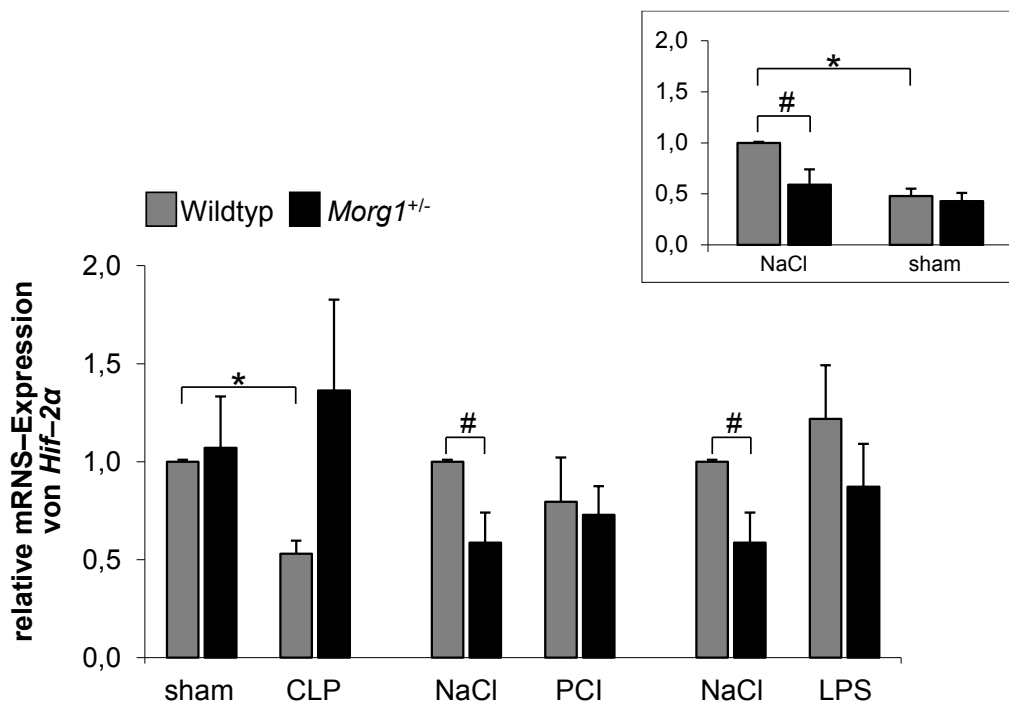


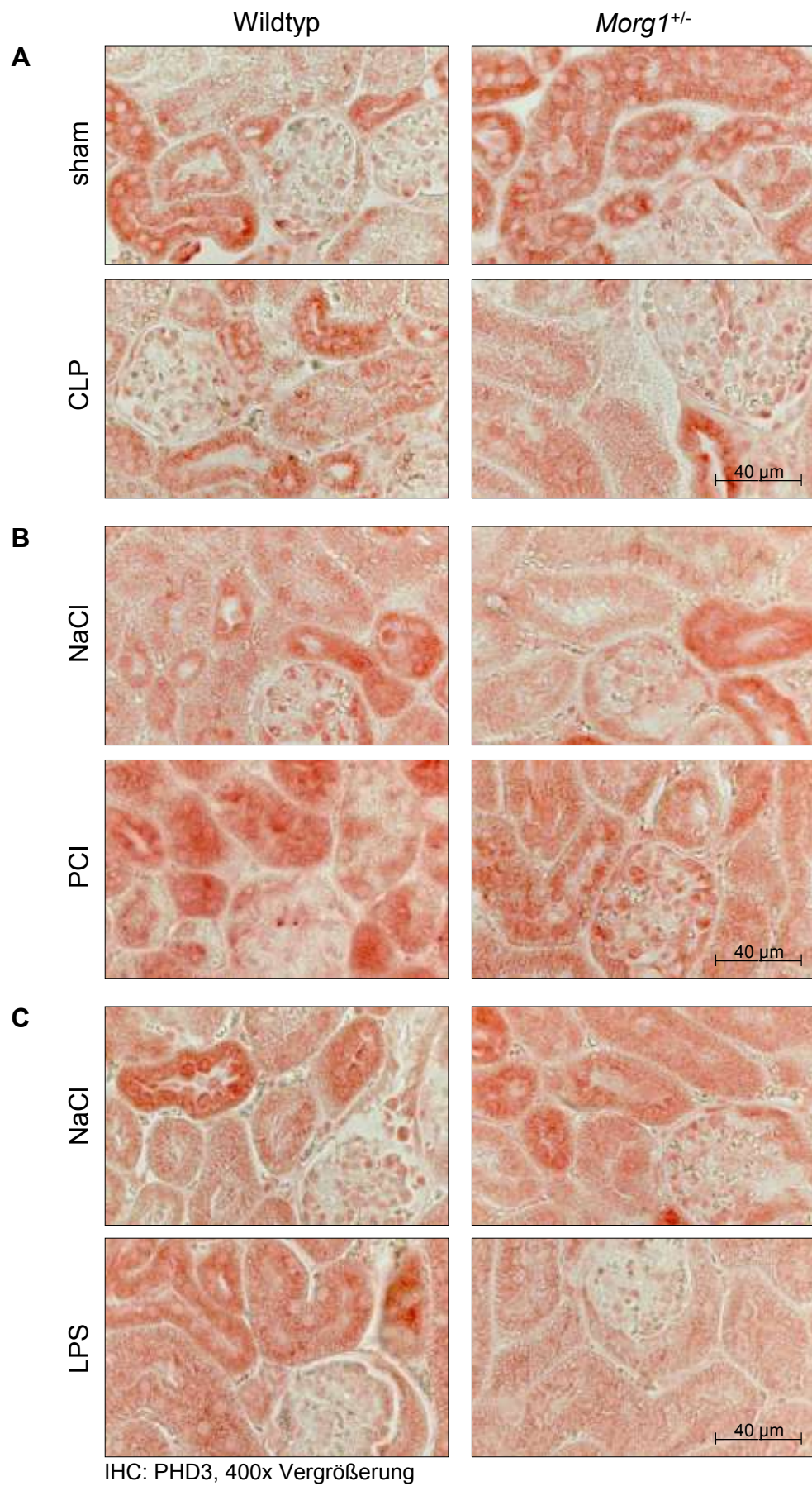
Abbildung 11: Analyse der mRNS-Expression von *Hif-2 α* via *real time* PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS. Die *Hif-2 α* -Expression ist als MW \pm SEM dargestellt. Für jede Behandlung sind die Daten in Relation zum Referenzgen und zum Kontroll-Wildtyp präsentiert. $n_{\text{CLP}}=7/9/11/9$; $n_{\text{PCI}}=9/8/9/12$; $n_{\text{LPS}}=9/8/10/12$. * $p<0,05$ sham-CLP versus CLP bzw. NaCl versus sham-CLP; # $p<0,05$ Wildtyp versus *Morg1^{+/-}*.

Nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Gabe waren die Expressionsmuster von *Hif-2 α* -mRNS und HIF-2 α -Protein im Gewebe der Nieren denen von *Hif-1 α* -mRNS und HIF-1 α -Protein konform.

4.2.4 Expression von PHD3

Dazu wurde die Expression von PHD3 in Wildtyp- und *Morg1^{+/-}*-Mäusen in den drei Modellen analysiert.

Die Protein-Expression von PHD3 nach der sham-CLP-OP war im tubulären Bereich der *Morg1^{+/-}*-Mausnieren höher im Vergleich zu denen der Wildtypiere. Auch im Vergleich zu den NaCl behandelten Tieren beider Genotypen akkumulierte PHD3 in den tubulären Zytoplasmen der sham-CLP operierten *Morg1^{+/-}*-Mausnieren stärker. Im Vergleich dazu war kein Unterschied in der Protein-Expression von PHD3 zwischen den NaCl behandelten *Morg1^{+/-}*- und Wildtypieren zu ermitteln. In den Nierenschnitten der NaCl behandelten Tieren konnten revers zu den sham-CLP operierten Mausschnitten dichte Kernfärbungen detektiert werden, die in den Schnitten der sham-CLP operierten Mäuse beider Genotypen nur vereinzelt vorkamen. Nach der CLP-Behandlung (**Abb. 12A**) sank die Protein-Expression von PHD3 im Zytoplasma und Nuklei der kortikalen Tubuli der Nieren in den Wildtypieren tendenziell ($p=0,065$) und in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen signifikant ($p<0,05$) (**Abb. 12D**). Entgegengesetzt dazu stieg die PHD3-Expression nach der Sepsis-Induktion via PCI in beiden Maus-Genotypen (**Abb. 12B**). Dabei war PHD3 in den beiden Sepsis-Modellen CLP und PCI in den Wildtyp- und *Morg1^{+/-}*-Mäusen gleich stark exprimiert. Die LPS-Applikation (**Abb. 12C**) führte in den Nieren der Wildtypiere zu einer erhöhten und kontrovers dazu in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen zu einer tendenziell verminderten PHD3-Expression im Vergleich zu den entsprechenden NaCl behandelten Kontrollmäusen. Die Protein-Expression von PHD3 wurde nach der LPS-Behandlung in den Wildtypmausnieren stärker detektiert als in den Nieren der *Morg1^{+/-}*-Tiere.



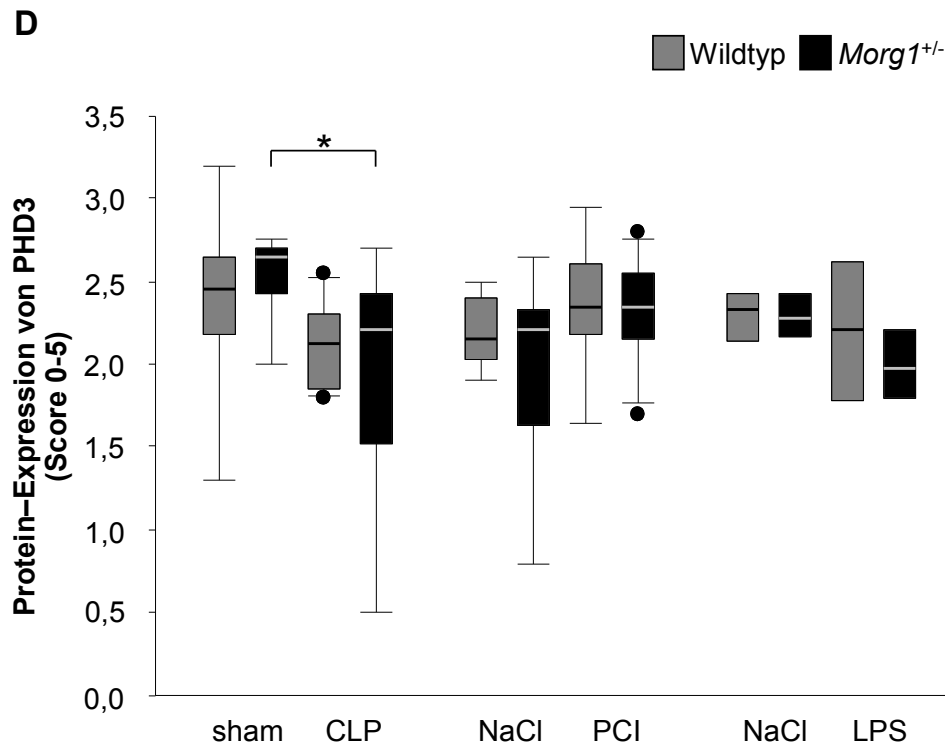


Abbildung 12: Analyse der Protein-Expression von PHD3 im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen. Die PHD3-Expression wurde durch IHC und Quantifizierung mit Hilfe eines Scores (0-5) analysiert. **(A-C)** Repräsentative Bilder der Nierenschnitte nach den Behandlungen **(A)** CLP, **(B)** PCI und **(C)** LPS. Vergrößerung: 400x. **(D)** Die relative Protein-Expression von PHD3 ist als MW \pm SEM dargestellt. $n_{CLP}=9/9/10/9$; $n_{PCI}=9/9/9/11$; $n_{LPS}=6/6/8/8$. * $p<0,05$ sham-CLP versus CLP.

Zudem wurde die mRNA-Expression von *Phd3* im Gesamtnierenlysat 24h nach Sepsis-Induktion via CLP und PCI sowie LPS-Behandlung analysiert und in der **Abbildung 13** dargestellt.

Die basale mRNA-Expression von *Phd3* in sham-CLP operierten *Morg1^{+/-}*-Mäusen war höher im Vergleich zum Wildtyp, aber signifikant geringer in NaCl behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen ($p<0,05$) verglichen mit den Wildtyp-Tieren. Das kleine Diagramm in **Abbildung 13** zeigt den direkten Vergleich der mRNA-Expression von *Phd3* der NaCl behandelten zu den sham-CLP operierten Tieren. Es wurde eine signifikant geringere *Phd3*-Expression in den NaCl behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen ($p<0,01$) im Vergleich zu den Kontroll-Wildtyp-Tieren beobachtet. Nach der sham-CLP-OP konnte eine geringere *Phd3*-Expression in den Nieren der Wildtypmäuse ($p<0,01$) verglichen mit den NaCl behandelten Wildtyp-Tieren gezeigt werden. In den Mausnieren der sham-

CLP operierten *Morg1^{+/-}*-Mäusen konnte keine weitere Verringerung der Expression im Vergleich zu den NaCl behandelten *Morg1^{+/-}*-Tieren detektiert werden.

In den Nieren der Wildtypiere wurde bei allen drei Modellen CLP, PCI und LPS eine geringere *Phd3*-Expression nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten in den CLP- und LPS-Modellen keine Veränderungen in der Expression von *Phd3* in den *Morg1^{+/-}*-Mausnieren im Vergleich zu den jeweiligen *Morg1^{+/-}*-Kontrolltieren ermittelt werden. Jedoch war nach Sepsis-Induktion im PCI-Modell in den behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen *Phd3* tendenziell höher exprimiert als in den *Morg1^{+/-}*-Kontrollen. Im Vergleich der beiden Maus-Genotypen war die mRNA-Expression von *Phd3* im Nierengewebe tendenziell höher in CLP operierten bzw. tendenziell geringer in LPS behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen verglichen zu den entsprechenden Wildtypieren.

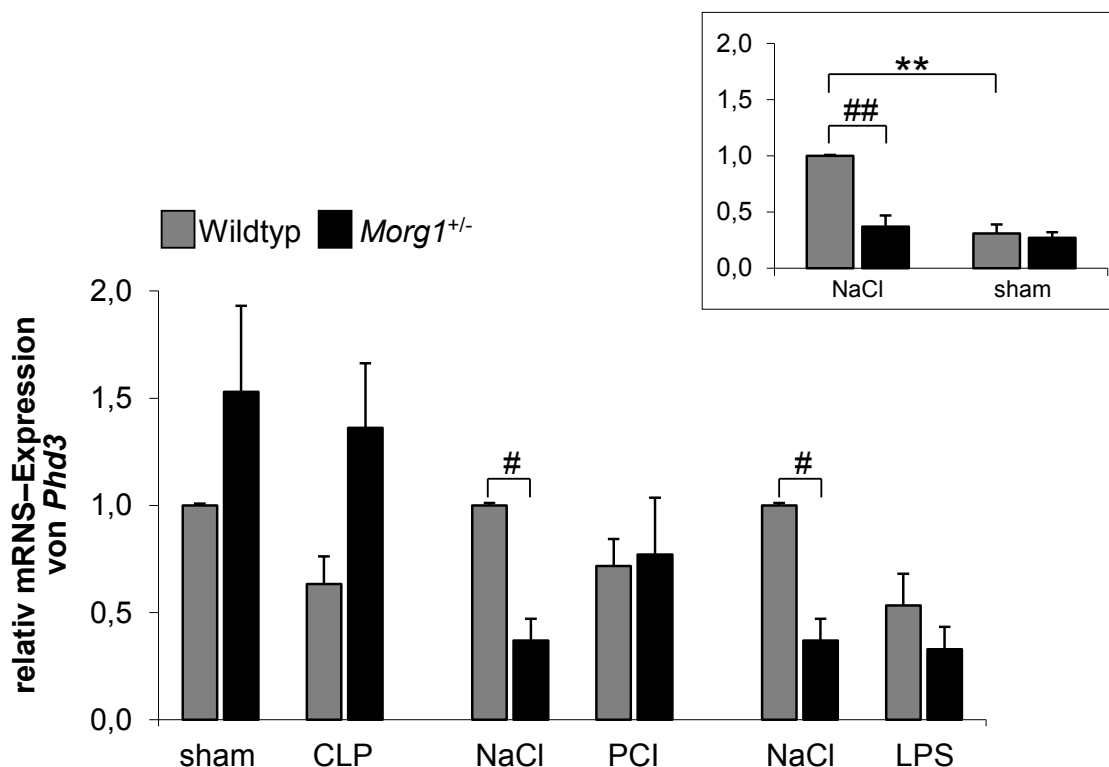


Abbildung 13: Analyse der mRNA-Expression von *Phd3* via *real time* PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS. Die *Phd3*-Expression ist als MW \pm SEM dargestellt. Für jede Behandlung sind die Daten in Relation zum Referenzgen und zum Kontroll-Wildtyp präsentiert. $n_{CLP}=7/9/11/9$; $n_{PCI}=9/8/9/12$; $n_{LPS}=9/8/10/12$. ** $p<0,01$ NaCl versus sham-CLP; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ Wildtyp versus *Morg1^{+/-}*.

Nach der PCI-Behandlung war kein Unterschied in der *Phd3*-Expression zwischen beiden Maus-Genotypen zu ermitteln.

Im Nierengewebe war die mRNA-Expression von *Phd3* in den NaCl behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen geringer im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen. Die verschiedenen Behandlungen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von *Phd3*-mRNA. Die Analyse des PHD3-Proteins in der Niere zeigte differente Expressionsmuster in den verschiedenen Modellen.

4.2.5 Analyse von HIF-Zielgenen

Um eine erhöhte Aktivität von HIF-1 α und HIF-2 α zu analysieren, wurden bekannte Transkriptionsgene von HIF wie EPO, Glukosetransporter 1 (GLUT1) und VEGF untersucht. Dabei wurden die Expression der *Epo*- und *Glut1*-mRNA im Gesamtnierengewebe mittels *real time* PCR und des VEGF-Proteins im Blutplasma durch ELISA beider Maus-Genotypen gemessen.

In der **Abbildung 14** ist die mRNA-Expression von *Epo* im Gesamtnierengewebe 24h nach Sepsis-Induktion via CLP und PCI sowie LPS-Gabe präsentiert.

Die basale mRNA-Expression von *Epo* war in den beiden Maus-Genotypen ohne Unterschied 24h nach der sham-CLP-OP. Dagegen zeigten die Daten der Modelle PCI und LPS einen basal tendenziellen Anstieg der Expression von *Epo* in den NaCl behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen im Vergleich zum entsprechenden Kontroll-Wildtyp. Im direkten Vergleich der NaCl behandelten zu den sham-CLP operierten Mäusen konnte eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression von *Epo* in den Nieren der sham-CLP operierten Mäusen ($p < 0,01$; $p < 0,001$) verglichen mit den NaCl behandelten Tieren beider Genotypen gezeigt werden (kleines Diagramm in **Abb. 14**).

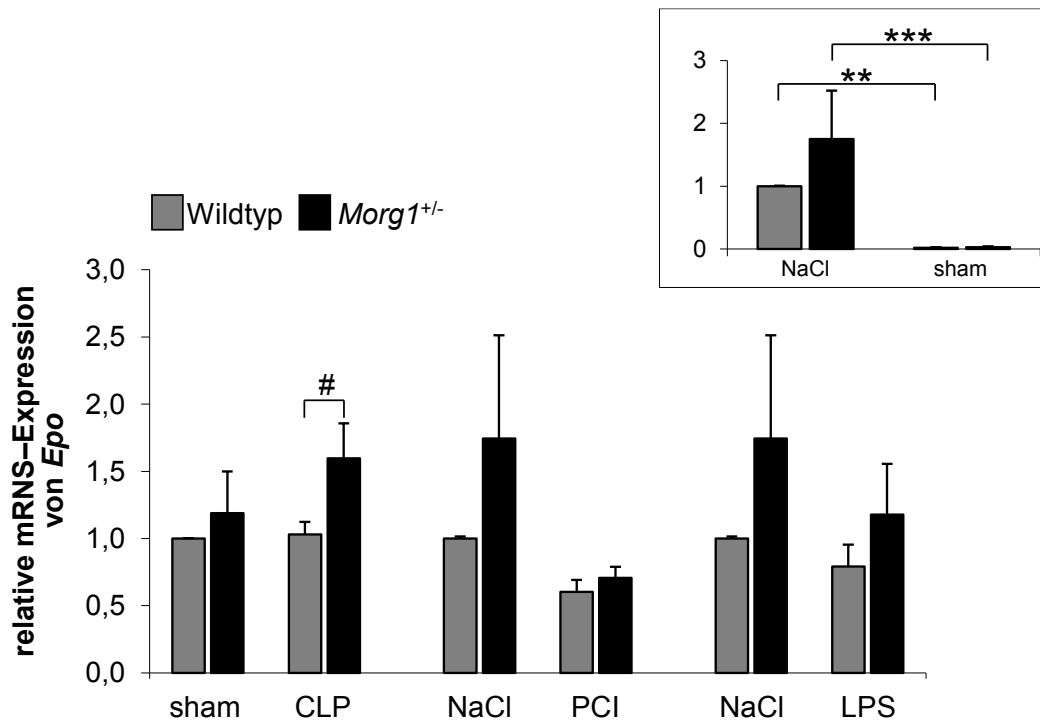


Abbildung 14: Analyse der mRNS-Expression von *Epo* via *real time* PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS. Die *Epo*-Expression ist als MW \pm SEM dargestellt. Für jede Behandlung sind die Daten in Relation zum Referenzgen und zum Kontroll-Wildtyp präsentiert. $n_{\text{CLP}}=7/9/11/9$; $n_{\text{PCI}}=9/8/9/12$; $n_{\text{LPS}}=9/8/10/12$. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ NaCl versus sham-CLP; # $p<0,05$ Wildtyp versus *Morg1*^{+/-}.

Nach CLP-Behandlung blieb die mRNS-Expression von *Epo* im Nierengewebe der Wildtypmäuse unverändert, aber stieg in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen tendenziell nach Sepsis-Induktion via CLP. Damit konnte eine signifikant höhere *Epo*-Expression in den CLP-operierten *Morg1*^{+/-}-Mäusen ($p<0,05$) verglichen mit den CLP-operierten Wildtyptieren gezeigt werden. Nach der PCI-Behandlung wurde eine leicht reduzierte mRNS-Expression von *Epo* in den Wildtypmäusen, jedoch eine starke Verminderung der Expression in den septischen *Morg1*^{+/-}-Mäusen detektiert. Dennoch war *Epo* im Nierengewebe der PCI-Mäuse beider Genotypen gleich niedrig exprimiert. Ähnlich wie im CLP-Modell zeigten die LPS behandelten Wildtyptiere keine Veränderung der *Epo*-Expression im Nierengewebe. Abweichend dazu wurde eine Abnahme der Expression von *Epo* in den *Morg1*^{+/-}-Mausnieren detektiert. Dabei war im Vergleich der Genotypen die *Epo*-Expression in den Nieren der *Morg1*^{+/-}-Mäuse tendenziell höher als in denen der Wildtyptiere.

Weiterhin wurde die mRNA-Expression von *Glut1* im Gesamtnierengewebe 24h nach CLP, PCI sowie LPS untersucht (**Abb. 15**).

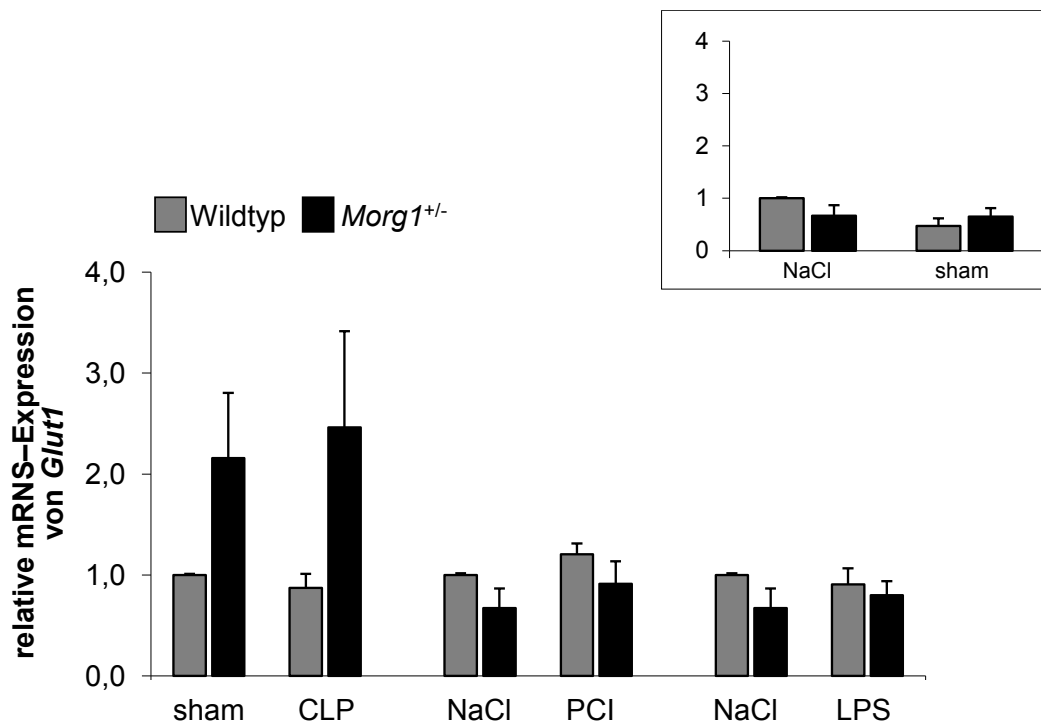


Abbildung 15: Analyse der mRNA-Expression von *Glut1* via *real time* PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS. Die *Glut1*-Expression ist als MW \pm SEM dargestellt. Für jede Behandlung sind die Daten in Relation zum Referenzgen und zum Kontroll-Wildtyp präsentiert. $n_{CLP}=7/9/11/9$; $n_{PCI}=9/8/9/12$; $n_{LPS}=9/8/10/12$.

Im CLP-Modell war die basale mRNA-Expression von *Glut1* tendenziell höher in sham-CLP operierten *Morg1*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zum Kontroll-Wildtyp. Im Gegensatz dazu war die *Glut1*-mRNA-Expression in den NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen tendenziell geringer verglichen mit den entsprechenden Wildtyptieren. Das kleine Diagramm in **Abbildung 15** zeigt den direkten Vergleich der NaCl behandelten zu den sham-CLP operierten Mäusen beider Genotypen.

In den Nieren der sham-CLP operierten Wildtypmäuse konnte eine tendenziell geringere mRNA-Expression von *Glut1* verglichen mit den NaCl behandelten Tieren detektiert werden. Die mRNA-Expression in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen blieb unverändert im Vergleich der sham-CLP operierten zu den NaCl behandelten Mäusen. Nach CLP-Behandlung war die mRNA-Expression von *Glut1* im Nierengewebe der Wildtypmäuse auf gleichem Niveau der sham-Tiere. In den

Morg1^{+/-}-Mäusen stieg die Expression von *Glut1* tendenziell nach Sepsis-Induktion im CLP-Modell, wobei die *Glut1*-Expression in den septischen *Morg1*^{+/-}-Mäusen tendenziell höher war verglichen mit septischen Wildtyptieren. Nach der PCI-Induktion konnten keine Unterschiede in der mRNS-Expression von *Glut1* in beiden Genotypen detektiert werden. Dennoch war *Glut1* in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen geringer exprimiert als in den Wildtyptieren. Im Modell LPS differierte die mRNS-Expressionen von *Glut1* in den Nierengewebe beider Genotypen nicht im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren. Auch im Vergleich der beiden Maus-Genotypen konnten keine Unterschiede 24h nach LPS-Applikation gefunden werden.

Die **Abbildung 16** zeigt die Proteinkonzentration von VEGF im Blutplasma 24h nach Sepsis-Induktion in den drei unterschiedlichen Sepsismodellen.

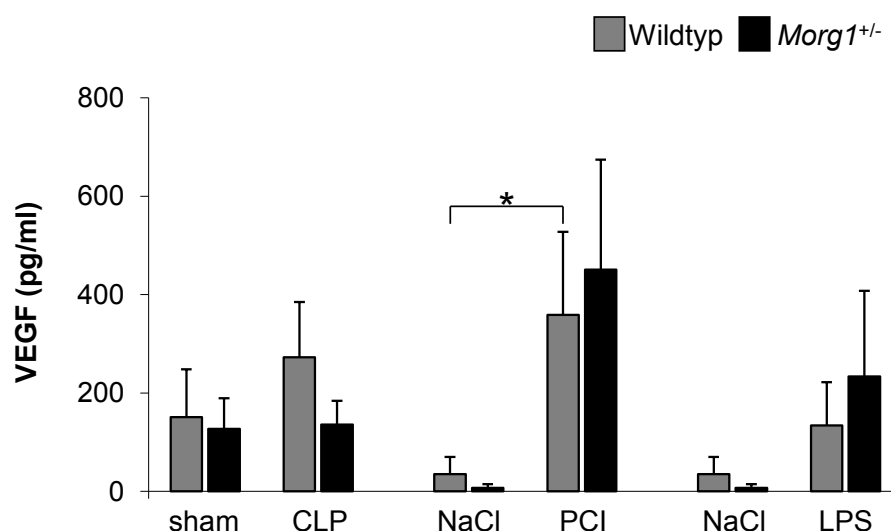


Abbildung 16: Analyse der Protein-Expression von VEGF im Blutplasma 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS. Die VEGF-Expression wurde via ELISA ermittelt und als MW \pm SEM dargestellt. Für jede Behandlung sind die Daten in Absolutwerten präsentiert. $n_{CLP}=6/6/8/7$; $n_{PCI}=6/6/6/7$; $n_{LPS}=6/6/8/8$. * $p<0,05$ NaCl versus PCI.

Die basalen Proteinkonzentrationen von VEGF im Blutplasma der sham-CLP operierten Mäuse beider Genotypen waren auf gleich hohem Niveau im Gegensatz zu den gemessenen Konzentrationen in den Blutplasmen der NaCl behandelten Tiere der Modelle PCI und LPS. Dabei war die VEGF-Konzentration in den NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen tendenziell geringer

im Vergleich zu den NaCl behandelten Wildtyptieren. In dem Modell CLP konnte nach Sepsis-Induktion in den Blutplasmen der Wildtypiere erhöhte Proteinkonzentrationen gemessen werden, die im Gegensatz dazu in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen nicht gefunden wurden. Eine signifikante Erhöhung der Blutplasma-Konzentration von VEGF war in den Wildtypmäusen 24h im PCI-Modell zu sehen ($p < 0,05$). In dem Blutplasma der *Morg1^{+/-}*-Mäuse konnte eine tendenziell stärkere Steigerung der VEGF-Konzentration gemessen werden im Vergleich zu den NaCl behandelten Kontroll- und den septischen Wildtyptieren. In beiden Genotypen wurde nach LPS-Applikation eine tendenziell höhere Konzentration von VEGF im Blutplasma ermittelt verglichen mit den entsprechenden NaCl behandelten Kontrolltieren.

Die analysierten HIF-Zielgene *Epo* und *Glut1* waren nicht mit der erhöhten HIF-1/2 α -Expression im Nierengewebe korreliert. Wohingegen VEGF im Blutplasma durch Sepsis und Endotoxämie erhöht exprimiert war.

4.3 Charakterisierung des Einflusses von MORG1 und HIF-1 α auf mögliche nekrotische Veränderungen des Nierengewebes nach einer Sepsis-Induktion bzw. LPS-Gabe

Der Nachweis sowie die Einschätzung von möglichen pathologischen Gewebeveränderungen in der Niere 24h nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Gabe wurde an in Paraffin eingebetteten Nierenschnitten via PAS-Reaktion erbracht.

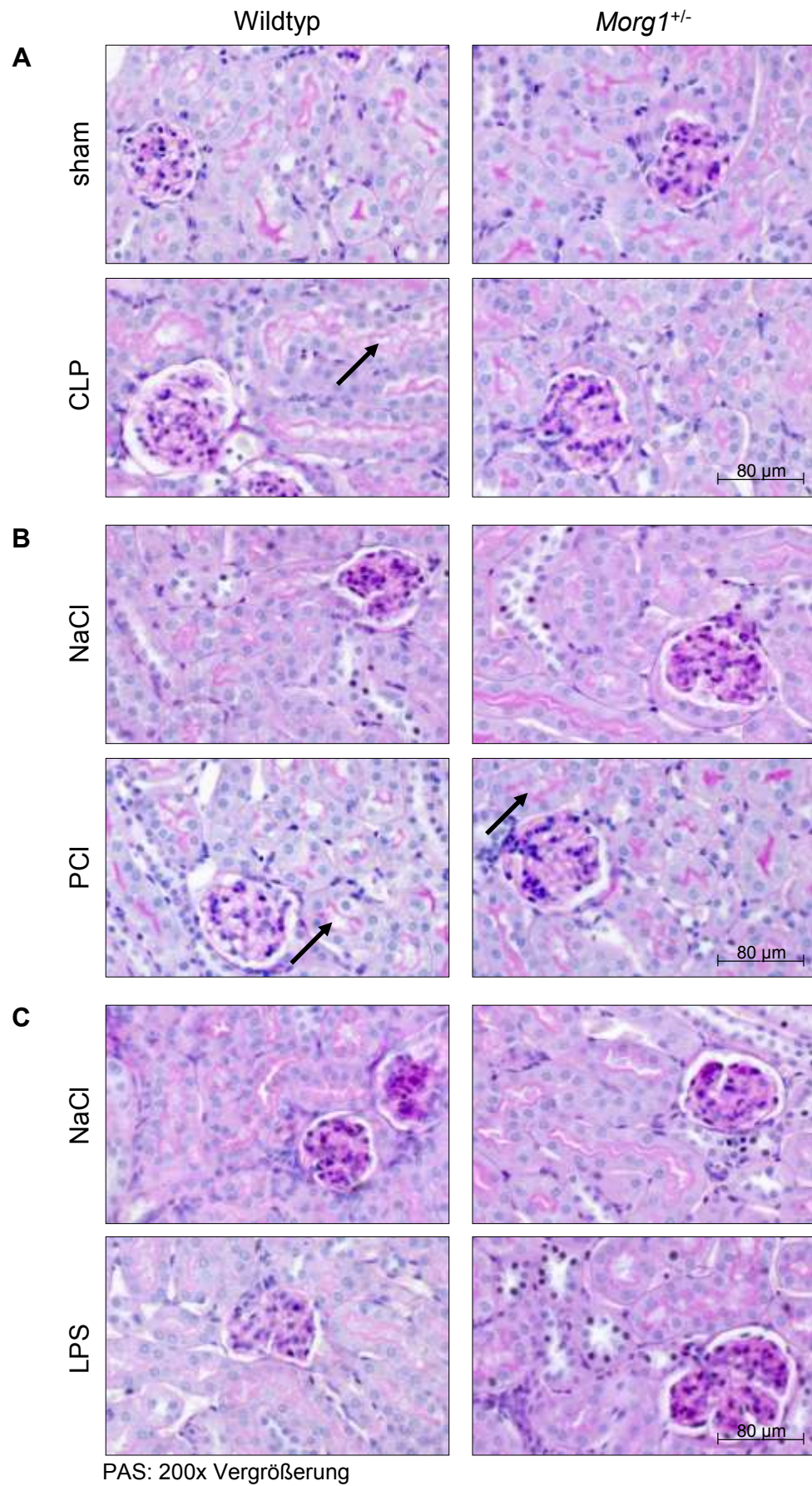
Die repräsentativen Bilder der Nierenschnitte nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS in der **Abbildung 17** zeigen die morphometrischen Veränderungen in den *Morg1^{+/-}*- im Vergleich zu Wildtypmäusen. Die Auswertungen wurden auf tubuläre Schädigungen beschränkt.

Das tubuläre Nierengewebe der sham-CLP operierten und der NaCl behandelten Versuchstiere war ohne Anzeichen von Dilatation und Vakuolenbildung nach dem Behandlungszeitraum. Dennoch zeigt die morphometrische Analyse der PAS-Reaktion (**Abb. 17A**) eine tendenziell intaktere Morphologie der Nierenschnitte von *Morg1^{+/-}*-Mäusen verglichen mit denen der Wildtypiere. Nach Sepsis-Induktion wurden signifikant nach CLP

($p < 0,05$) und tendenziell nach PCI tubulusnekrotische Schäden im Nierengewebe der Wildtypen gefunden im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Tieren. In den Nierengeweben der *Morg1^{+/-}*-Mäuse konnten nach Sepsis-Induktion via CLP signifikant sowie via PCI tendenziell weniger Dilatation und Vakuolenbildung detektiert werden verglichen mit den behandelten Wildtypmäusen (**Abb. 17B**). Die Pfeile in der **Abbildung 17A** und **B** markieren den sichtbaren Verlust sowie die Abflachung des Bürstensaums der luminalen Epithelmembran im Tubulus sowie die tubuläre Vakuolenbildung im septischen Nierengewebe beider Genotypen. Im Vergleich zu den NaCl behandelten Mäusen wiesen die Nieren der LPS behandelten Tiere keine nekrotischen Veränderungen in den Tubuli nach LPS-Applikation auf (**Abb. 17C**).

Eine zusätzliche morphologische Gewebeveränderung aufgrund der sham-CLP oder CLP-OP konnte nicht beobachtet werden (**Abb. 17D**).

Das Nierengewebe der *Morg1^{+/-}*-Mäuse zeigte nach Sepsis-Induktion weniger nekrotische Veränderungen verglichen mit den septischen Wildtyptieren. Im Gegensatz dazu wies die Endotoxämie mit LPS keine morphologischen Veränderungen in der Niere auf.



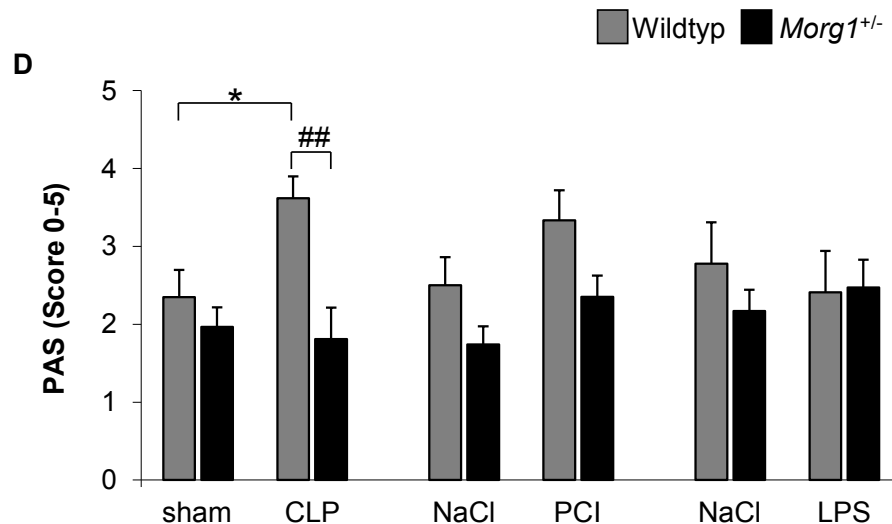
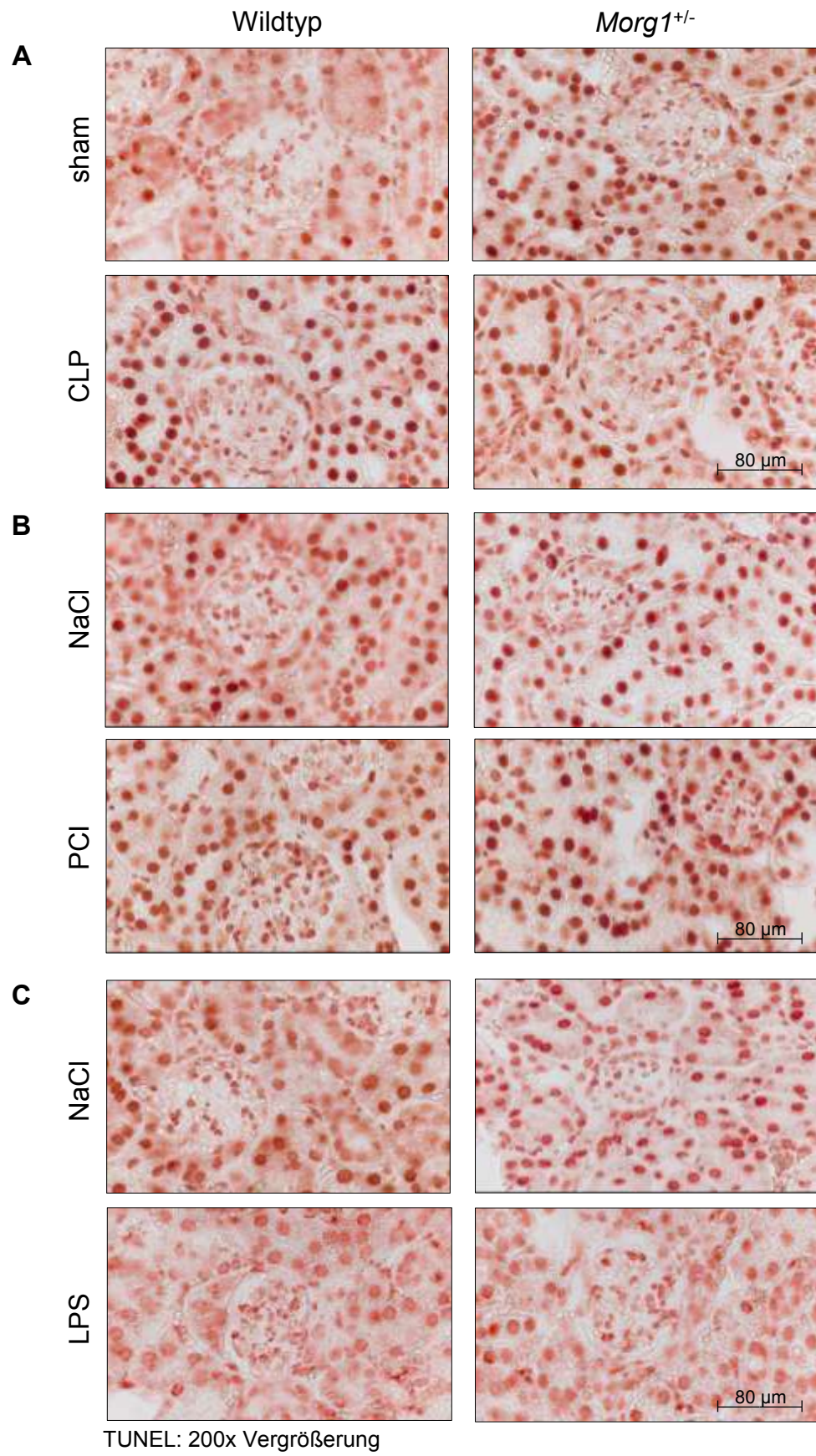


Abbildung 17: Charakterisierung der pathologischen Veränderungen im Nierengewebe 24h nach den Behandlungen. Die PAS-Reaktion wurde durch Quantifizierung mit Hilfe eines Scores (0-5) analysiert. (A-C) Repräsentative Bilder der Nierenschnitte nach den Behandlungen (A) CLP, (B) PCI und (C) LPS. Vergrößerung: 200x. (D) Morphometrische Analyse als MW \pm SEM. $n_{CLP}=9/9/10/8$; $n_{PCI}=9/9/9/11$; $n_{LPS}=6/6/8/8$. * $p<0,05$ sham-CLP versus CLP; ## $p<0,01$ Wildtyp versus Morg1^{+/-}.

4.4 Beurteilung der Rolle von MORG1 und HIF-1 α auf mögliche Sepsis bzw. LPS induzierte apoptotische Veränderungen im Nierengewebe

Der TUNEL-Assay an in Paraffin eingebetteten Nierengewebeschnitten wurde zur Analyse der Apoptose 24h nach CLP, PCI sowie LPS durchgeführt, um die Ausprägung der Apoptose zu quantifizieren (Hughes und Gobe 2007). Dabei wurde die Farbintensität der tubulären Nuklei einbezogen. Die gemessene Farbintensität (Grauwert) korreliert mit dem Auftreten apoptotischer Veränderungen im Nierengewebe und wurde mit den entsprechenden Kontrollgruppen verglichen.

Die morphometrische Analyse des TUNEL-Assay in CLP, PCI und LPS behandelten Wildtyp- und Morg1^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren ist in der **Abbildung 18** gezeigt.



Im Nierengewebe der sham-CLP operierten Wildtypiere wurde eine signifikant geringere Farbintensität ($p < 0,05$) gemessen verglichen mit den sham-CLP operierten *Morg1*^{+/-}-Mäusen. Dieser Trend war in den Nieren der NaCl behandelten Versuchstiere nicht zu sehen im Vergleich beider Maus-Genotypen. Nach CLP-Induktion wurde eine tendenziell höhere Intensität in dem Nierengewebe der Wildtypiere gemessen verglichen mit den sham-CLP-Mäusen. Im Gegensatz dazu war die ermittelte Farbintensität in den Nierenschnitten der CLP behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäuse tendenziell geringer im Vergleich zu den sham-CLP operierten *Morg1*^{+/-}-Tieren. Diese zeigten 24h nach CLP-Behandlung ähnliche apoptotische Veränderungen auf dem Niveau der gemessenen Farbintensitäten der NaCl behandelten Mäuse.

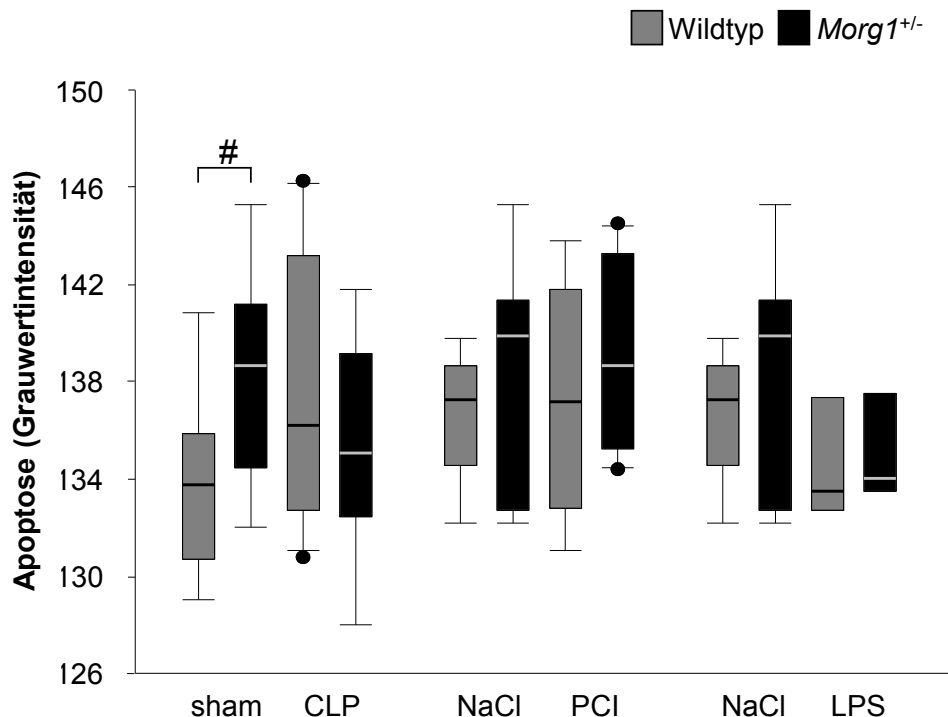


Abbildung 18: Bewertung der apoptotischen Veränderungen via TUNEL. (A-C) Repräsentative Bilder der Nierenschnitte nach den Behandlungen (A) CLP, (B) PCI und (C) LPS. Vergrößerung: 200x. (D) Die Farbintensität (Grauwert) wurde in den Kernen gemessen und als MW \pm SEM dargestellt. n_{CLP} = 9/9/11/9; n_{PCI} = 9/9/9/12; n_{LPS} = 9/9/8/8. # $p < 0,05$ Wildtyp versus *Morg1*^{+/-}.

Nach der PCI-Induktion war die Erhöhung der Grauwertintensität im Nierengewebe nur geringfügig in beiden Genotypen, dennoch wurden in den Nieren der *Morg1*^{+/-}-Mäuse leicht höhere apoptotische Vorgänge ermittelt

verglichen mit den PCI behandelten Wildtyptieren. Die LPS–Applikation hatte keinen Einfluss auf die Farbintensität bzw. konnten keine apoptotischen Veränderungen im Nierengewebe beider Maus–Genotypen festgestellt werden.

Eine durch Sepsis induzierte Veränderung am Nierengewebe, vermittelt durch Apoptose, wurde auch durch den immunhistochemischen Nachweis der aktiven Caspase 3 an in Paraffin eingebetteten Nierengewebeschnitten dokumentiert. Dabei wurden Nierenschnitte von Wildtyp– und *Morg1^{+/-}*–Mäusen 24h nach CLP–, PCI– und LPS–Behandlung analysiert indem Spots per Areal ausgezählt wurden (**Abb. 19**).



Abbildung 19: IHC–Quantifizierung der aktiven Caspase 3 durch Auszählen der Spots per Areal.

Die Analyse demonstrierte eine tendenzielle Zunahme der aktiven Caspase 3 nach sham–CLP–OP im Vergleich zu den NaCl behandelten Mäusen beider Genotypen (**Abb. 20**).

In den NaCl behandelten und sham–CLP operierten *Morg1^{+/-}*–Mäusen konnte signifikant nach PCI ($p < 0,05$) und LPS ($p < 0,05$) bzw. tendenziell nach CLP weniger aktive Caspase 3–Färbung detektiert werden verglichen mit den entsprechenden Wildtyptieren. Die apoptotische Aktivität in den behandelten Wildtyp– ($p < 0,001$) und *Morg1^{+/-}*–Mäusen ($p < 0,05$) war signifikant erhöht im Vergleich zu den korrespondierenden sham–CLP behandelten Tieren. Dabei war in den CLP behandelten *Morg1^{+/-}*–Tieren signifikant weniger Apoptose detektierbar ($p < 0,05$) verglichen mit den Wildtypmäusen nach Peritonitis–Induktion durch CLP. Zudem konnte im PCI–Sepsis–Modell ($p < 0,01$) sowie nach LPS–Gabe ($p < 0,001$) eine signifikant erhöhte Anzahl an apoptotischen

Vorgängen detektiert werden in beiden Genotypen und im Vergleich zu den entsprechenden NaCl behandelten Kontrolltieren. Auch in den Modellen PCI und LPS wurde eine geringere Caspase 3–Akkumulation in den behandelten *Morg1*^{+/-}– verglichen mit den Wildtypmäusen beobachtet.

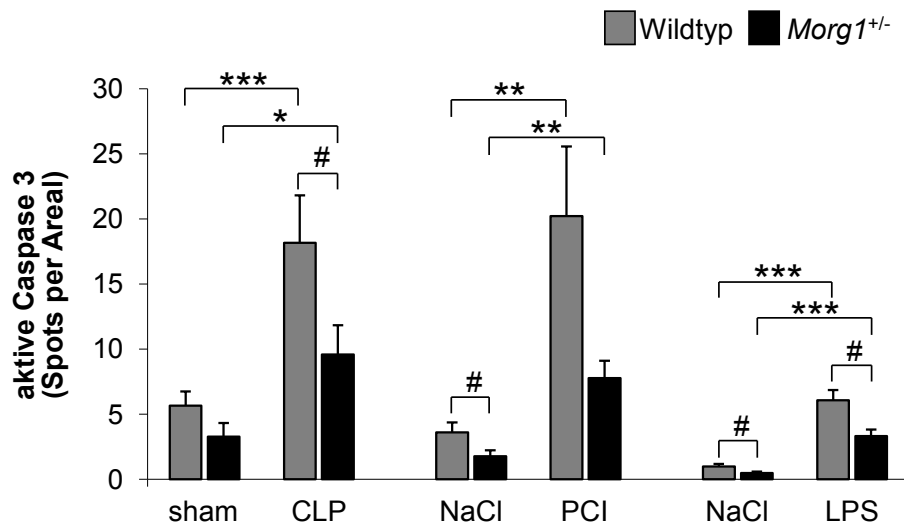


Abbildung 20: Apoptose–Analyse via IHC–Detektion der aktiven Caspase 3. Die morphometrische Analyse wurde durch Spots per Areal von 10 gleich großen Arealen pro Nierenschnitt 24h nach CLP–, PCI– sowie LPS–Behandlung ermittelt und als MW ± SEM dargestellt. $n_{CLP}=9/9/10/8$; $n_{PCI}=9/9/9/11$; $n_{LPS}=6/6/8/8$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ sham–CLP/NaCl versus CLP/PCI/LPS; # $p<0,05$ Wildtyp versus *Morg1*^{+/-}.

In beiden Genotypen konnte eine positive Korrelation der Caspase 3–Akkumulation und den Behandlungen CLP, PCI und LPS in der Niere gezeigt werden. Dabei waren die apoptotischen Veränderungen des Nierengewebes in den *Morg1*^{+/-}–Mäusen signifikant geringer im Vergleich zu den Wildtyptieren.

4.5 Einfluss von *MORG1* und *HIF–1α* auf die Inflammation und Infiltration im Nierengewebe nach Sepsis–Induktion bzw. LPS–Gabe

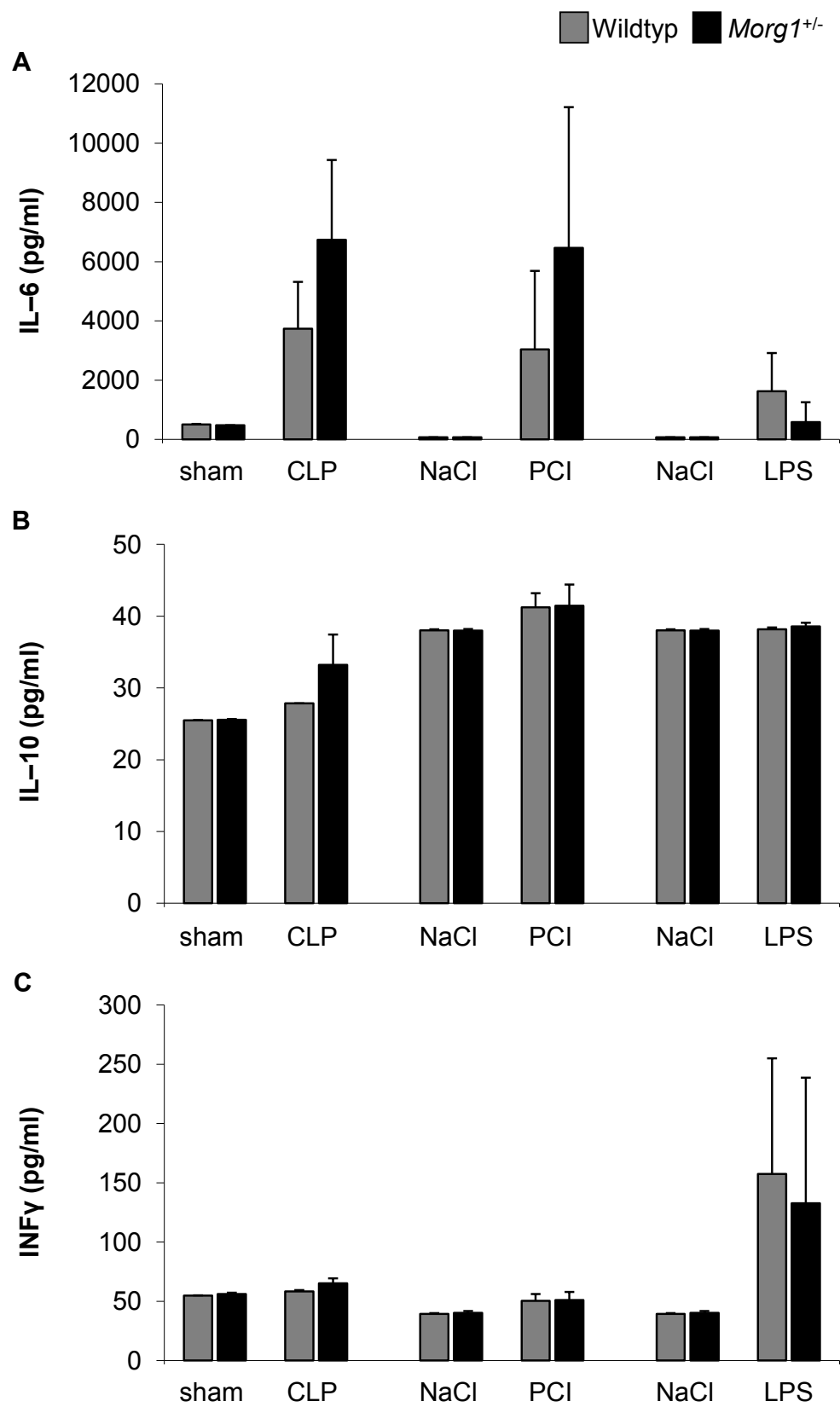
4.5.1 Analyse der inflammatorischen Zytokine

Zytokine wie die inflammatorischen Interleukine IL–6, IL–10 und INF γ sowie das inflammatorische Zytokin *Tnfa* wurden nach 24h im Blutplasma durch CBA bzw. nach 0h, 6h und 24h im Vollblut durch *real time* PCR ermittelt. Dabei wurden die entsprechenden Proben der *Morg1*^{+/-}– im Vergleich zu denen der Wildtypmäuse nach den Behandlungsmodellen CLP, PCI und LPS analysiert.

Die Dartsellung in **Abbildung 21** für IL-6 (**Abb. 21A**), IL-10 (**Abb. 21B**) und INF γ (**Abb. 21C**) zeigen 24h nach den Behandlungen keinen Unterschied zwischen sham-CLP operierten bzw. den NaCl behandelten Tieren beider Genotypen. Dagegen konnten beim Vergleich zwischen den Modellen eine basal höhere IL-6-Konzentration und ein basal geringeres IL-10-Niveau in den sham-CLP operierten Mäusen verglichen mit den NaCl behandelten Tieren beider Genotypen gezeigt werden (**Abb. 21A und B**). Einen erhöhten IL-6- und IL-10-Spiegel (ausgenommen IL-10, LPS) im Blutplasma der *Morg1^{+/-}*- und Wildtypmäuse wurde tendenziell 24h nach CLP-, PCI- und LPS-Behandlung im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Tieren gefunden. Im Gegensatz dazu war der INF γ -Spiegel 24h nach Sepsis-Induktion nicht erhöht. Allerdings konnte nach LPS-Anwendung eine gesteigerte Konzentration von INF γ in beiden Genotypen verglichen mit NaCl behandelten Mäusen ermittelt werden (**Abb. 21C**).

Die **Abbildung 21D** zeigt keine Unterschiede in der basalen Expression von *Tnfa* zwischen den Proben der Genotypen oder sham-CLP operierten und NaCl behandelten Tieren der verschiedenen Modelle im Vollblut der *Morg1^{+/-}*- und Wildtypmäuse. Die *Tnfa*-mRNS-Expression war 4h und 24h nach den Behandlungen im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Tieren bzw. zum Zeitpunkt 0h in allen Modellen erhöht. Dabei konnte eine zeitabhängige Erhöhung der mRNS-Expression von *Tnfa* im Versuchszeitraum über 24h nach Sepsis-Induktion via CLP und PCI sowie LPS-Applikation (ausgenommen PCI, HZ, 24h) gezeigt werden. Eine tendenziell geringere Expression von *Tnfa*-mRNS im Vollblut der *Morg1^{+/-}*-Mäuse wurde 4h nach CLP- und PCI-Induktion sowie 24h nach PCI- und LPS-Behandlung im Vergleich zu den Wildtyptieren detektiert.

Zu der Analyse der inflammatorischen Zytokine konnte kein statistischer Nachweis erbracht werden, aufgrund des geringen, begrenzten Volumen des gewonnenen Bluts wurden nur ein Teil (n=2-4) der Versuchstiere einbezogen.



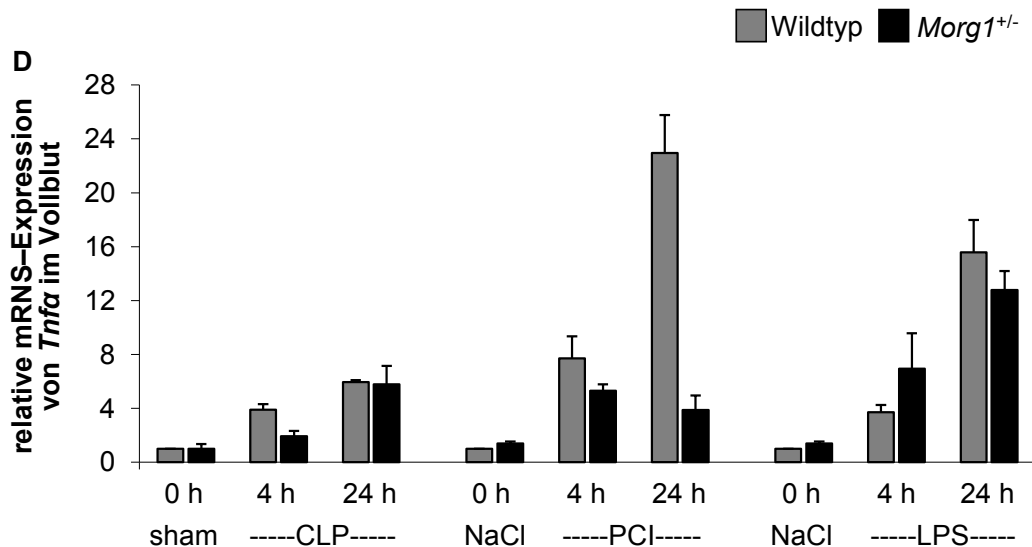
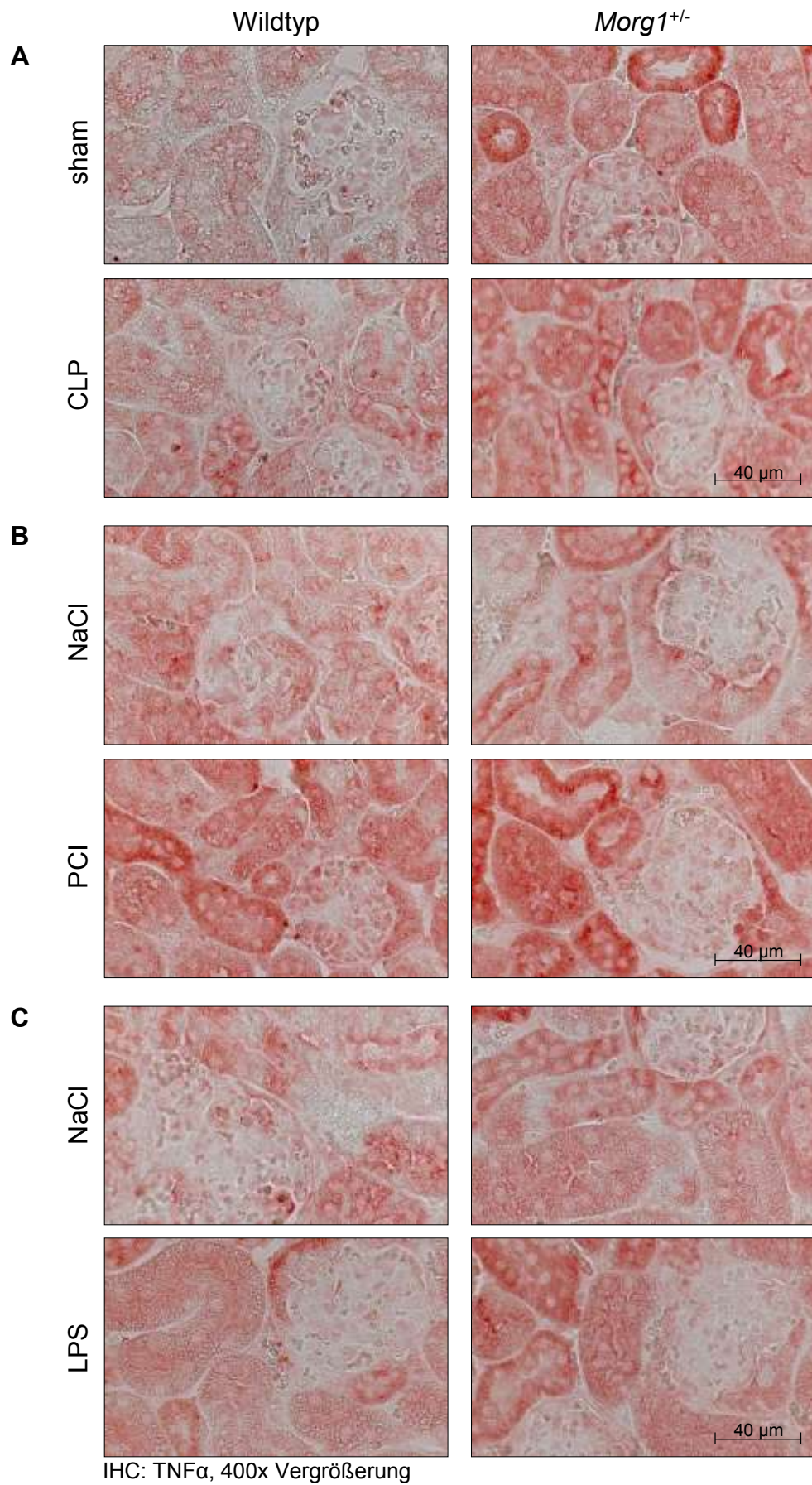


Abbildung 21: Analyse der Zytokine im Vollblut 24h nach Sepsis-Induktion oder LPS-Gabe. Die Konzentrationen von (A) IL-6, (B) IL-10 und (C) INF γ wurden via CBA und (D) *Tnfa*-mRNS-Expression via *real time* PCR analysiert und als MW \pm SEM dargestellt. n =2-4. Keine Statistik erbracht.

Zusätzlich wurde die Protein-Expression von TNF α mittels IHC und die m-RNS-Expression des Gens *Tnfa* durch *real time* PCR im Gesamtnierengewebe in Wildtyp- und *Morg1*^{+/-}-Mäusen 24h nach Induktion einer Sepsis bzw. Injektion von LPS analysiert. Die repräsentativen Bilder der IHC in **Abbildung 22** zeigen die TNF α -Expression im kortikalen Nierengewebe nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS.

Im tubulären Bereich der Nierenschnitte der *Morg1*^{+/-}-Mäuse konnte eine geringe Akkumulation von TNF α in sham-CLP operierten sowie 24h nach Sepsis-Induktion via CLP im Vergleich zu den Wildtypmäusen gezeigt werden. Dies korrelierte mit den IHC-Analysen von TNF α -Protein im glomerulären Bereich der Nierenschnitte (**Abb. 22A**). Nach der PCI-Behandlung wurde eine Erhöhung von TNF α im Zytoplasma der Tubuluszellen der *Morg1*^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu den NaCl behandelten und zu den behandelten Wildtypmäusen detektiert. In den Glomeruli der PCI behandelten Tiere beider Genotypen konnte eine erhöhte TNF α -Protein-Expression ohne Unterschied zwischen den Genotypen ermittelt werden (**Abb. 22B**).



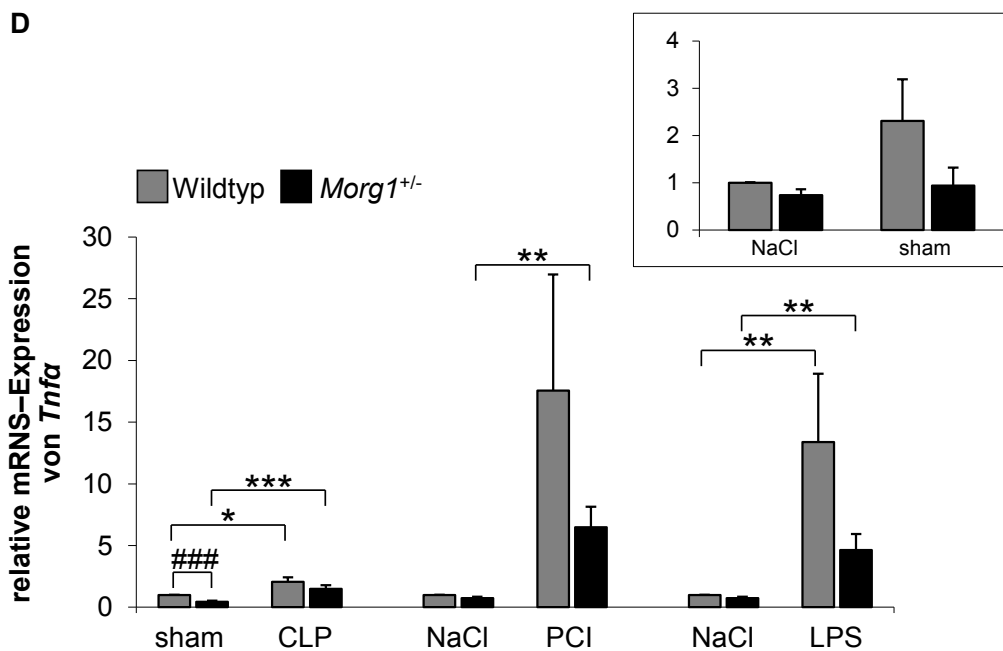


Abbildung 22: Analyse der Expression von TNF α im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen. Die TNF α -Expression wurde durch IHC und Quantifizierung mit Hilfe eines Scores (0-5) analysiert. **(A-C)** Repräsentative Bilder der Nierenschnitte nach den Behandlungen **(A)** CLP, **(B)** PCI und **(C)** LPS. Vergrößerung: 400x. $n_{CLP}=9/9/10/8$; $n_{PCI}=9/9/9/11$; $n_{LPS}=6/6/8/8$. **(D)** Die *Tnfa*-Expression ist als MW \pm SEM dargestellt. Für jede Behandlung sind die Daten in Relation zum Referenzgen und zum Kontroll-Wildtyp präsentiert. $n_{CLP}=7/9/11/9$; $n_{PCI}=9/8/9/12$; $n_{LPS}=9/8/10/12$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ sham-CLP/NaCl versus CLP/PCI/LPS; ### $p<0,001$ Wildtyp versus *Morg1*^{+/-}.

Dagegen zeigte die LPS-Applikation keinen Anstieg der Protein-Expression von TNF α in beiden Genotypen im Zytoplasma der Tubuli 24h nach der Behandlung, aber in den Proben der behandelten Wildtypmännchen einen geringen Anstieg (**Abb. 22C**).

In der **Abbildung 22D** ist zusätzlich die mRNA-Expression von *Tnfa* gezeigt.

Die basale Expression in den Nierengeweben der sham-CLP operierten *Morg1*^{+/-}-Tiere war signifikant geringer ($p<0,001$) verglichen mit den sham-CLP operierten Wildtypmäusen. Dieses basale Expressionsmuster war ähnlich für die beiden Modelle PCI und LPS in den NaCl behandelten Tieren zusehen.

Der Gesamtbetrag der Genexpression von *Tnfa* in der Niere war signifikant erhöht in Sepsis ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$) sowie in LPS behandelten Tieren beider Genotypen ($p<0,01$) im Vergleich zu den entsprechenden sham-CLP operierten bzw. NaCl behandelten Tieren (ausgenommen PCI, Wildtyp). Die

Expression von *Tnfa* in *Morg1^{+/-}*-Mäusen war tendenziell geringer im Nierengewebe im Vergleich zu den Wildtypmäusen 24h nach Peritonitis-Induktion via CLP und PCI sowie LPS-Gabe. Im Vergleich aller Modelle wurde eine deutlich stärkere Expression von *Tnfa* nach PCI- und LPS-Behandlung als nach CLP-OP detektiert.

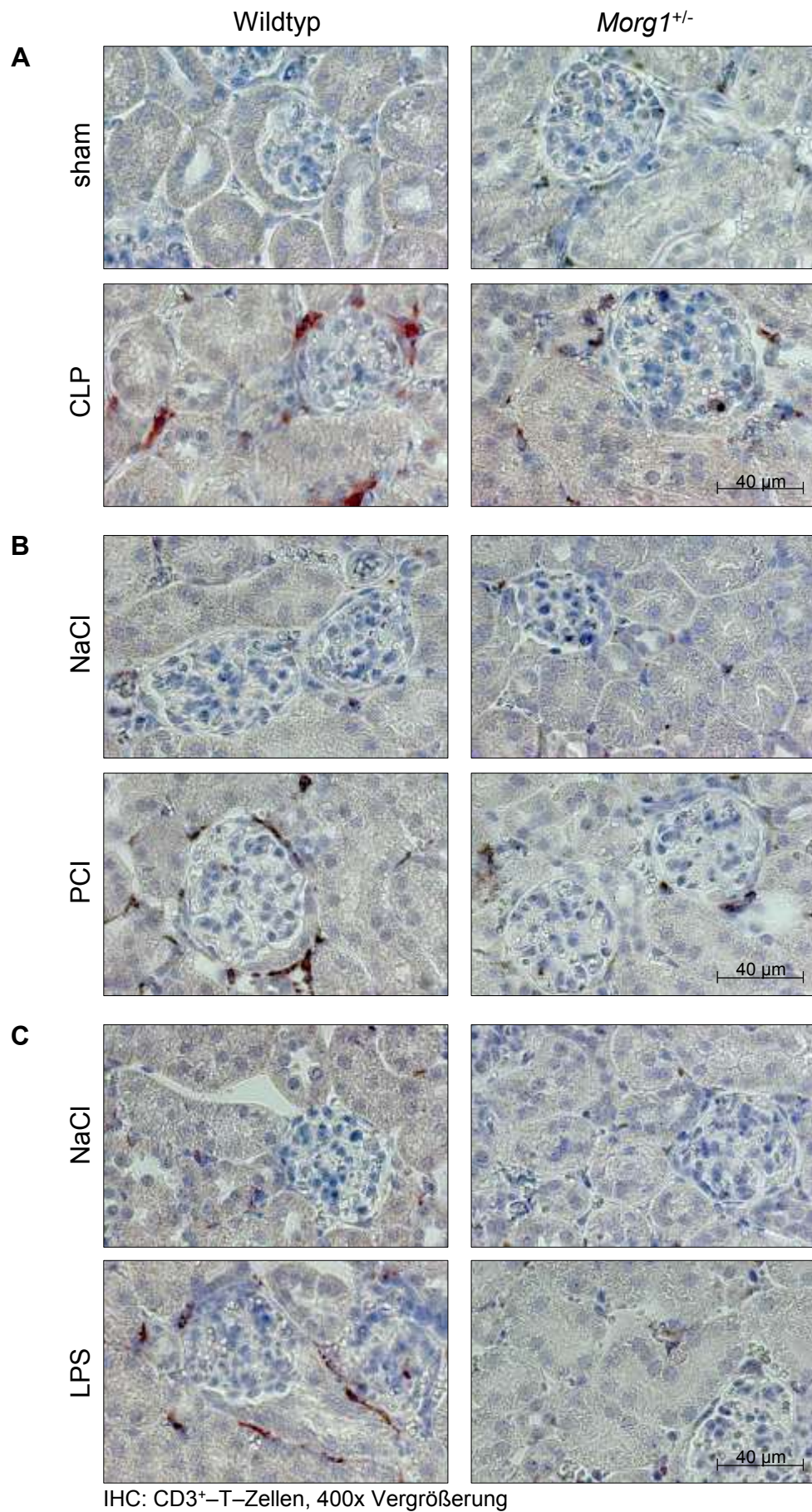
Ein proinflammatorischer Zytokinsturm im Blutplasma konnte 24h nach den verschiedenen Behandlungen nicht ermittelt werden. Parallel dazu war die mRNA von dem inflammatorischen Zytokin TNF α im Vollblut und im Nierengewebe teilweise signifikant erhöht exprimiert, wobei in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen die Expression geringer war als in den Wildtyptieren. Kontrovers dazu war die TNF α -Protein-Expression im Nierengewebe.

4.5.2 Analyse der T-Zell-Infiltration

Der Nachweis von CD3⁺-T-Zellen erfolgte an in Paraffin eingebetteten Nierengewebeschnitten von Wildtyp- und *Morg1^{+/-}*-Mäuse. Pro Mausschnitt wurden 10 äquale Areale beurteilt.

Eine T-Zell-Infiltration in das Nierengewebe aufgrund der Sepsis-Induktion in allen drei Modellen wurde 24h nach den Behandlungen in der IHC gefunden (**Abb. 23**).

In dem Nierengewebe der NaCl behandelten Tiere der PCI- und LPS-Modelle beider Genotypen konnte eine sehr geringe Infiltration von CD3⁺-T-Zellen gefunden werden. Jedoch wurde eine höhere basale T-Zell-Infiltration in den sham-CLP operierten verglichen mit NaCl behandelten Tieren beider Genotypen 24h nach sham-CLP-OP detektiert. Nach Sepsis-Induktion durch CLP bzw. PCI und nach LPS-Gabe waren die CD3⁺-T-Zellen tendenziell bzw. signifikant ($p < 0,05$; $p < 0,01$) mehr in Wildtypmäusen verglichen mit den sham-CLP operierten bzw. NaCl behandelten Tieren vorhanden. Eine signifikant erhöhte ($p < 0,05$) Infiltration von CD3⁺-T-Zellen war nur nach PCI in *Morg1^{+/-}*-Mäusen zu sehen. Bei beiden Peritonitis-Sepsis-Modellen und nach LPS-Anwendung war die T-Zell-Infiltration signifikant höher in den erkrankten Wildtyp- als in den erkrankten *Morg1^{+/-}*-Mäusen ($p < 0,01$; $p < 0,001$).



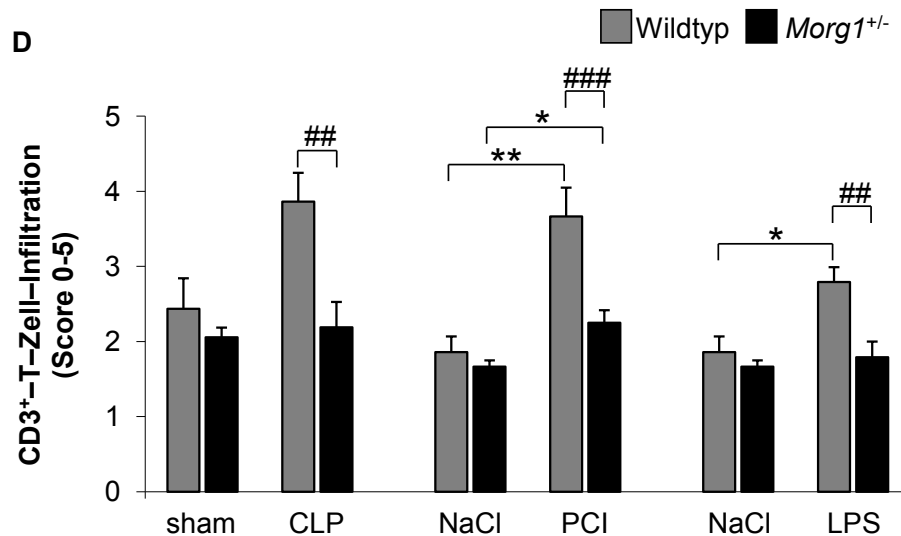


Abbildung 23: Analyse der Protein-Expression von CD3⁺-T-Zellen im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen. Die Infiltration wurde durch IHC und Quantifizierung mit Hilfe eines Scores (0-5) analysiert. (A-C) Repräsentative Bilder der Nierenschnitte nach den Behandlungen (A) CLP, (B) PCI und (C) LPS. Vergrößerung: 400x. (D) Die relative Protein-Expression von CD3⁺-T-Zellen ist als MW ± SEM dargestellt. $n_{CLP}=9/9/10/8$; $n_{PCI}=9/9/9/11$; $n_{LPS}=6/6/8/8$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ NaCl versus PCI/LPS; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ Wildtyp versus *Morg1*^{+/-}.

Die Induktion einer Sepsis oder einer Endotoxämie führte zu einer T-Zell-Infiltration in das Nierengewebe in den Wildtyp-Tieren und nicht in das Gewebe der *Morg1*^{+/-}-Mäuse 24h nach den Behandlungen.

4.6 Bewertung der Nierenfunktion mithilfe der Parameter Kreatinin, BUN, NGAL und ACR

Die renalen Retentionsmarker Kreatinin und BUN sowie der Funktionsparameter NGAL wurden im Blutplasma über eine enzymatische, kolorimetrische Messung ermittelt. Die Blutplasmaproben von den behandelten Wildtyp- und *Morg1*^{+/-}-Mäusen 24h in den drei Modellen wurden mit den entsprechenden Kontrollmäusen verglichen und die Nierenfunktionsparameter als absolute Werte angegeben.

4.6.1 Analyse von Kreatinin im Blutplasma

Die basalen Niveaus von Kreatinin waren annähernd 2-fach höher in sham-CLP operierten Mäusen beider Genotypen verglichen mit den NaCl behandelten Mäusen der PCI- und LPS-Modelle, aber ohne signifikanten

Unterschied zwischen den Genotypen (**Abb. 24**). Der Blutplasmaspiegel von Kreatinin war signifikant ($p < 0,05$) erhöht in den behandelten Wildtyp- und *Morg1^{+/-}*-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen 24h nach CLP- und LPS-Anwendung (tendenziell nach LPS, Wildtyp). Im Vergleich mit den Daten der CLP- und LPS-Behandlung waren geringe Veränderungen nachzuweisen 24h post PCI. Zwischen den behandelten Wildtyp- und *Morg1^{+/-}*-Mäusen wurden keine signifikanten Unterschiede 24h nach Sepsis-Induktion und LPS-Injektion detektiert (**Abb. 24**).

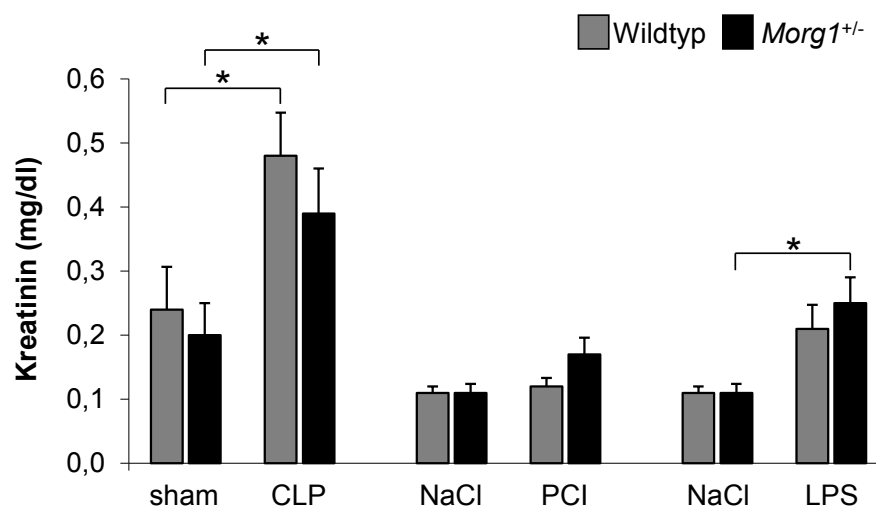


Abbildung 24: Analyse des Kreatinin-Spiegels im Blutplasma 24h nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Applikation. Die Kreatinin-Konzentration wurde über enzymatische Kolorimetrie gemessen und ist als MW \pm SEM dargestellt. $n_{CLP}=9/9/8/9$; $n_{PCI}=9/8/9/12$; $n_{LPS}=9/8/12/12$. * $p < 0,05$ sham-CLP/NaCl versus CLP/LPS.

4.6.2 Analyse von BUN im Blutplasma

Die Analyse der Plasmakonzentration von Harnstoff-Stickstoff im Blutplasma ist in **Abbildung 25** gezeigt.

Die basalen Werte von BUN waren höher in sham-CLP operierten Mäusen beider Genotypen im Vergleich zu NaCl behandelten Versuchstieren der PCI- und LPS-Behandlungen. In den sham-CLP und CLP operierten *Morg1^{+/-}*-Mäusen war die BUN-Konzentration tendenziell geringer verglichen mit den sham-CLP operierten bzw. CLP operierten Wildtypmäusen. Der Blutplasmaspiegel von BUN war 24h nach der CLP-Behandlung tendenziell in den behandelten Wildtyptieren und signifikant in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen ($p < 0,05$)

im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe erhöht. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde im PCI- und LPS-Modell detektiert, wobei eine gering höhere BUN-Konzentration in *Morg1^{+/-}* im Vergleich zu Wildtypmäusen im Blutplasma gemessen wurde (**Abb. 25**).

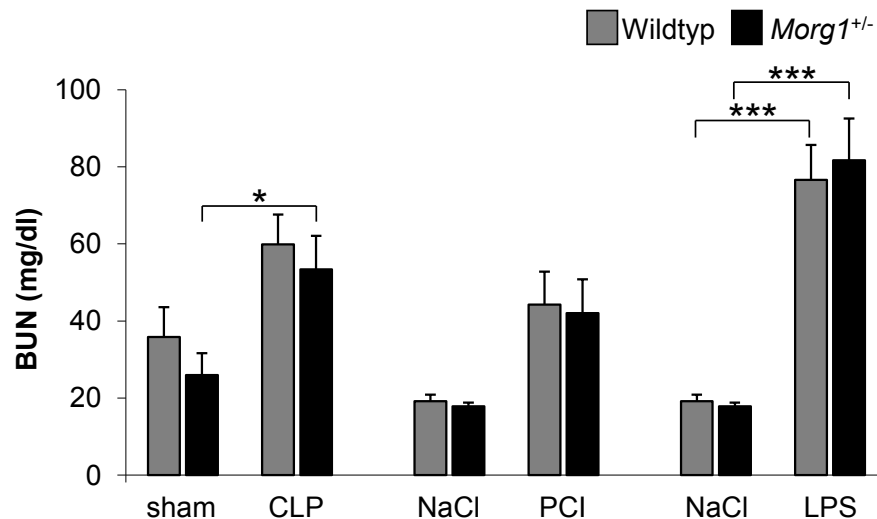


Abbildung 25: Analyse von BUN 24h nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Applikation. Die BUN-Konzentration wurde über enzymatische Kolorimetrie gemessen und ist als MW \pm SEM dargestellt. $n_{CLP}=9/9/8/9$; $n_{PCI}=9/8/9/12$; $n_{LPS}=9/8/12/12$. * $p<0,05$; *** $p<0,001$ sham-CLP/NaCl versus CLP/LPS.

4.6.3 Analyse von NGAL im Blutplasma

Die Untersuchungen von NGAL im Blutplasma beider Maus-Genotypen und der verschiedenen Behandlungsmodelle sind in **Abbildung 26** gezeigt.

Die basalen NGAL-Konzentrationen im Blutplasma waren höher in sham-CLP operierten Wildtyp- und *Morg1^{+/-}*-Mäusen im Vergleich zu den NaCl behandelten Tieren in den PCI- und LPS-Modellen. In unbehandelten und behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen war die NGAL-Konzentration tendenziell niedriger verglichen mit den unbehandelten und behandelten Wildtypmäusen bei CLP-Behandlung (**Abb. 26**). Weiterhin konnte ein signifikant ($p<0,001$) erhöhter NGAL-Blutplasmaspiegel 24h nach Sepsis-Induktion via CLP und PCI sowie LPS-Gabe in Wildtyp- und *Morg1^{+/-}*-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen gezeigt werden. Gegensätzlich zu dem CLP-Modell konnte nach PCI- und LPS-Behandlung erhöhte Blutplasma-

konzentrationen von NGAL in *Morg1^{+/-}* verglichen mit den Wildtyptieren gemessen werden.

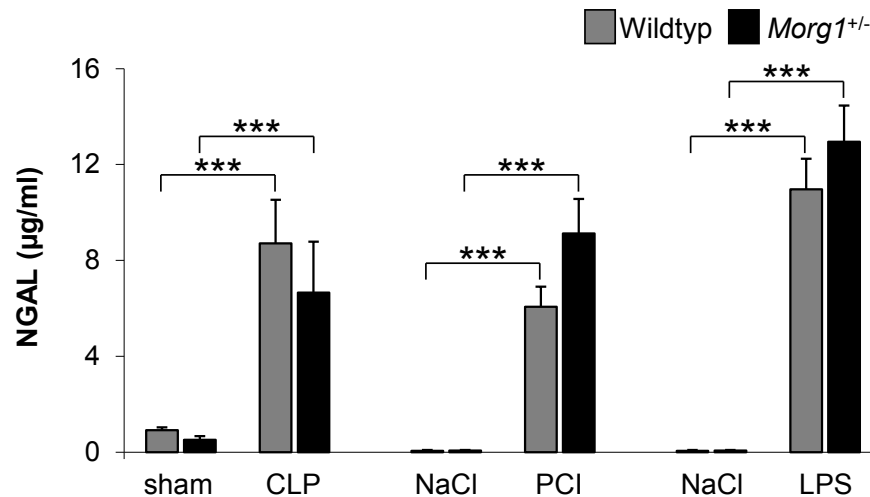


Abbildung 26: Analyse von NGAL im Blutplasma 24h nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Applikation. Die NGAL-Konzentration wurde über enzymatische Kolorimetrie gemessen und ist als MW \pm SEM dargestellt. $n_{CLP}=9/9/12/7$; $n_{PCI}=9/8/9/10$; $n_{LPS}=9/8/12/10$. *** $p<0,001$ sham-CLP/NaCl versus CLP/PCI/LPS.

4.6.4 Analyse von ACR im Urin

Die Ausscheidung von Proteinen in Relation zum ausgeschiedenen Kreatinin über die Niere ist ein weiterer Nierenfunktionsparameter, der im gewonnenen Urin der Mäuse gemessen wurde. Die überlebenden, schwer erkrankten Mäuse mit Anurie gaben über den Versuchszeitraum von 24h keinen Urin ab bzw. konnte bei diesen Tieren auch kein Spontanurin gewonnen werden. Für die Analyse der Konzentrationen von Albumin und Kreatinin wurden die Proben nach den drei verschiedenen Behandlungen via ELISA bzw. enzymatischer Kolorimetrie gemessen. Die Ratio von Albumin und Kreatinin im Harn der behandelten Mäuse wurde mit der Ratio der entsprechenden Kontroll-Wildtypiere verglichen und als absolute Werte angegeben.

Nach der sham-CLP-OP stieg der ACR bei beiden Maus-Genotypen verglichen mit den NaCl behandelten Mäusen (**Abb. 27**). Dabei war der ermittelte ACR in den *Morg1^{+/-}*-Tieren zweifach höher 24h nach sham-CLP-OP und im Gegensatz dazu nur halb so hoch bei NaCl-Behandlung im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Wildtypieren. Dieser Trend war auch in den CLP,

PCI und LPS behandelten Mäusen zu sehen. Die CLP-Behandlung zeigte ein Anstieg der Albumin/Kreatinin-Ratio in beiden Maus-Genotypen verglichen mit den entsprechenden sham behandelten Tieren, wobei in *Morg1^{+/-}*-Mäusen tendenziell höhere Werte ermittelt wurden im Vergleich zu den CLP behandelten Wildtyptieren. Nach der PCI-Behandlung konnte im Urin der Wildtypiere eine signifikante ($p<0,05$) und im *Morg1^{+/-}*-Mausurin eine tendenzielle Erhöhung ($p=0,051$) der ACR verglichen mit den entsprechenden NaCl behandelten Mäusen ermittelt werden. Kontrovers zu der CLP-Anwendung war die Ratio zweifach höher in PCI behandelten Wildtyptieren im Vergleich zu den PCI behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen. Auch 24h nach LPS-Applikation war die Albumin/Kreatinin-Ratio tendenziell höher bei den Wildtypmäusen und signifikant in *Morg1^{+/-}* ($p<0,01$) verglichen mit den entsprechenden NaCl behandelten Mäusen. Die ermittelte Ratio der LPS behandelten Wildtypiere war dabei höher als in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen.

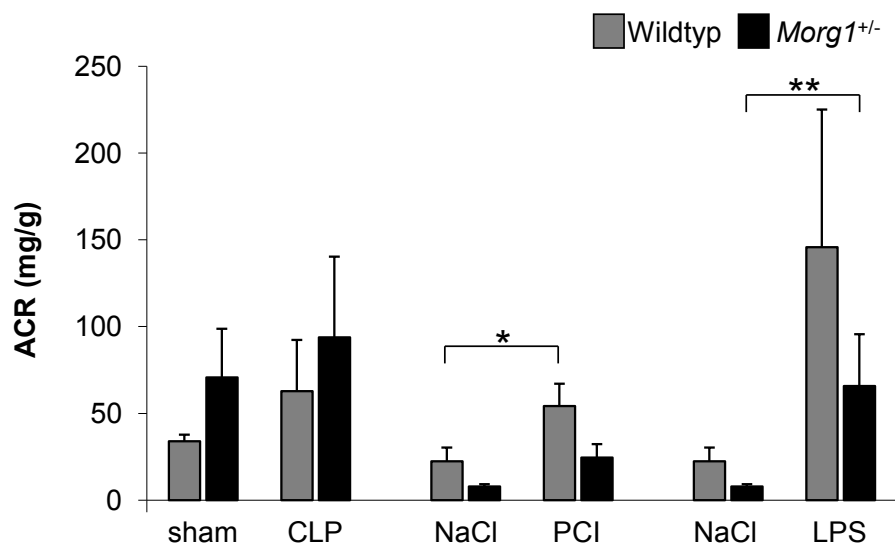


Abbildung 27: Analyse von ACR im Urin 24h nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Applikation. Die Konzentrationsbestimmung von Albumin erfolgte durch ELISA und die von Kreatinin via enzymatischer Messung. Die Ratio ist als MW \pm SEM dargestellt. $n_{CLP}=8/9/8/8$; $n_{PCI}=5/6/8/7$; $n_{LPS}=5/6/5/6$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ NaCl versus PCI/LPS.

Die analysierten Nierenfunktionsparameter waren 24h nach CLP-, PCI- und LPS-Behandlung in beiden Genotypen, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen, erhöht.

4.7 Einfluss von *MORG1* und *HIF-1 α* auf das Überleben bei den drei Behandlungsmodellen CLP, PCI und LPS

Die Studien zum Überleben wurden für beide Sepsis-Modelle CLP und PCI sowie für das LPS-Modell im Vergleich zu den sham-CLP operierten und den NaCl behandelten Tiergruppen (für Wildtyp und *Morg1^{+/-}*-Mäuse gleichermaßen) über 72 Stunden beobachtet.

Die Analyse zeigt eine größere Sterberate der *Morg1^{+/-}*-Mäuse nach CLP (**Abb. 28A**) und PCI (**Abb. 28B**) verglichen mit den Wildtypmäusen. Nach einem Zeitraum von 72h starben 4 *Morg1^{+/-}*-Mäuse und 1 Wildtypmaus der CLP-Behandlung. Die PCI-Behandlung forderte nach 72 Stunden 6 *Morg1^{+/-}*-Mäuse ($p < 0,05$) und 3 Wildtyptiere. Die Überlebensrate nach der LPS-Applikation lag bei den *Morg1^{+/-}*-Mäusen bei 100% und bei den Wildtyptieren bei 80% (**Abb. 28C**).

Die Kontrolltiere beider Genotypen, sham-CLP operiert und NaCl behandelt, waren über den gesamten Versuchszeitraum vital.

Die Studien zum Überleben zeigten eine größere Sterberate der *Morg1^{+/-}*-Mäuse nach einer Sepsis-Induktion.

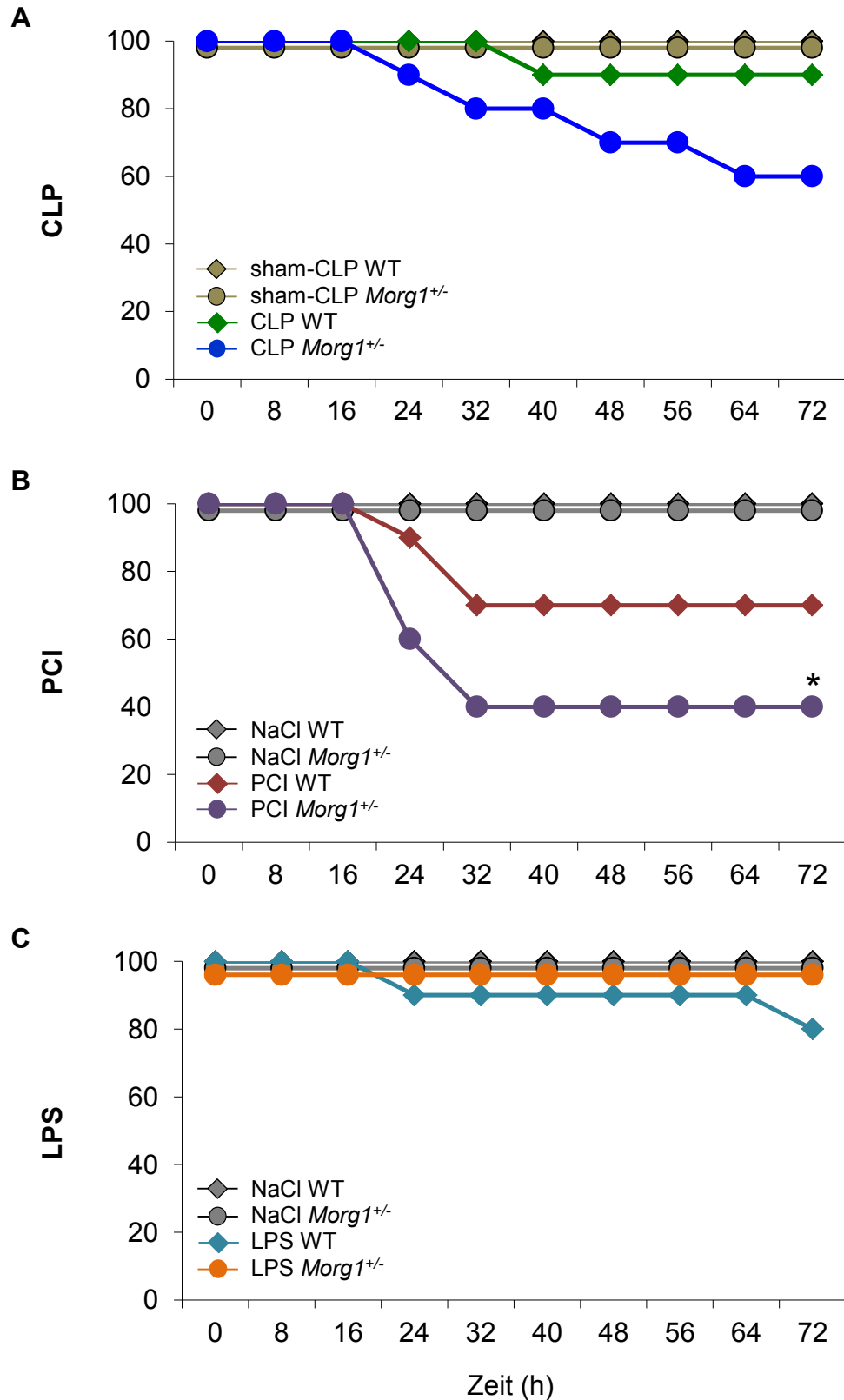


Abbildung 28: Studien zum Überleben der Sepsis-Modelle CLP, PCI und der LPS-Behandlung über 72 Stunden. Die Überlebensrate ist als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. n=10. *p<0,05 NaCl versus PCI.

5 Diskussion

Sepsis ist eine generalisierte, hyperinflammatorische Wirtsantwort, die durch eine Infektion hervorgerufen wird. Die Niere ist Ziel einer Sepsis assoziierten Organdysfunktion (Russell et al. 2000). Ein Sepsis induziertes akutes Nierenversagen tritt dabei in annähernd der Hälfte der septischen Patienten in deutschen Krankenhäusern auf (Uchino et al. 2005). Die in der Literatur beschriebenen Ursachen für die Entstehung eines septischen ANV sind vielfältig. In einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass das Sepsis assoziierte Nierenversagen mit beeinträchtigter renaler Mikrozirkulation (Wang et al. 2011) bzw. geringerer arterieller Blutversorgung sowie Vasokonstriktion zusammenhängt (Terra et al. 2005). Der Hypoxie induzierte Faktor HIF-1 α ist essentiell in der zellulären Adaptation an Hypoxie vermittelte Zustände im Gewebe. Unter normoxischen Bedingungen wird durch PHD3 die Hydroxylierung von HIF-1/2 α vermittelt, dass die proteasomale Degradation von HIF-1/2 α über den Ubiquitin-E3-Ligasekomplex zur Folge hat (Appelhoff et al. 2004, Hammerschmidt et al. 2009, Haase et al. 2009). Das Gerüstprotein MORG1 stabilisiert dabei PHD3, sodass diese die Stabilisierung von HIF-1/2 α involvieren. Die Untersuchungen von Hopfer et al. zeigten, dass MORG1 die Expression von HIF-1 α verringert, wenn MORG1 und PHD3 interagieren (Hopfer et al. 2006). Zudem wurde eine protektive Wirkung in heterozygoten *Morg1*-Mäusen (*Morg1*^{+/-}-Mäuse) gegen renale Apoptose und tubuläre Schädigung beobachtet (Hammerschmidt et al. 2009). Weiterhin konnte eine verminderte Nierenentzündung, weniger proinflammatorische Zytokine sowie eine verbesserte Nierenfunktion in den heterozygoten Tieren detektiert werden verglichen mit den Wildtypmäusen nach renaler Ischämie/Reperfusion (Hammerschmidt et al. 2009).

Die Rolle von MORG1 und HIF-1 α in der Sepsis induzierten Nierenschädigung wurde bisher noch nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal das heterozygote *Morg1*-Mausmodell in Untersuchungen zur Sepsis und Endotoxämie verwendet. Dazu wurde die hypothetische Frage aufgestellt, ob die Hochregulation von HIF-1 α in dem Sepsis assoziierten ANV

einen protektiven Effekt in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen hat im Vergleich zu den Wildtyptieren oder nicht. Neben der Arbeit von Hammerschmidt et al. demonstrierten auch andere, frühere Behandlungsmodelle eine positive Wirkung einer gesteigerten HIF-1 α -Aktivität (Bergeron et al. 1999, Bernhardt et al. 2006b, Hammerschmidt et al. 2009). Allerdings wurde ebenso ein verschlechternder Effekt in den Nierenzellen aufgrund einer verstärkten Inflammation beschrieben, dass durch das hochregulierte HIF-1 α resultiert war (Thiel et al. 2007, Kiss et al. 2012, Georgiev et al. 2012). Um die Fragestellung dieser Arbeit zu klären, wurde in den *Morg1^{+/-}*-Tieren Sepsis bzw. Endotoxämie induziert und durch Beurteilung ausgesuchter Parameter wie die Protein-Expression, die Morphologie, die Apoptose, die Inflammation sowie die Funktion im Nierengewebe analysiert und mit den Wildtyptieren verglichen. Zudem wurde die systemische Auswirkung der Reduktion von MORG1 und/oder HIF-1/2 α -Stabilisierung in Studien zum Überleben in beiden Maus-Genotypen mit allen Behandlungen untersucht.

In der Literatur sind hauptsächlich drei Modelle der Sepsis-Induktion bekannt (Buras et al. 2005), die alle Limitationen und Vorteile haben (Fink 2008). Die Endotoxämie durch LPS-Applikation ist verbunden mit einer Sofortreaktion durch die Aktivierung der proinflammatorischen Immunantwort (Cohen 2002). Von größerer medizinischer Relevanz sind die Modelle CLP und PCI. Die beiden Modelle induzieren eine Infektion des Peritoneums mit einem septischen Erkrankungsbild einschließlich der hämodynamischen sowie der immunologischen Veränderungen (Browne und Leslie 1976, Wichterman et al. 1980). Bei der PCI wird dabei eine definierte Keimzahl und -zusammensetzung einer Bakteriensuspension appliziert (Lorenz et al. 1994). Im Gegensatz zum CLP-Modell, bei dem die Qualität und Quantität der Keimflora unbekannt ist. Das CLP-Modell hat möglicherweise die größte klinische Relevanz und gilt als das ideale Sepsis-Modell, um eine humane mittelschwere Sepsis in einem Tiermodell zu simulieren (Wichterman et al. 1980, Buras et al. 2005, Yilmaz Savcun et al. 2013).

In dieser Arbeit waren die Versuchstiere in drei Gruppen je nach Modell CLP, PCI oder LPS eingeteilt. Während des Versuchszeitraums von 24h wurde das

äußere Erscheinungsbild aller Versuchstiere durch das Bewertungsmodell CSS nach Gonnert et al. beurteilt. Damit konnte die Krankheitsschwere nach den verschiedenen Behandlungen analysiert werden (Gonnert et al. 2011). Unsere Daten zum CSS zeigten in allen drei Modellen 24h nach den jeweiligen Behandlungen eine Erhöhung der Krankheitsschwere, das mit einer signifikanten Verschlechterung des äußeren Erscheinungsbilds korrelierte. Dabei wurden zwischen den beiden Maus-Genotypen keine signifikanten Unterschiede detektiert. Weiterhin zeigte die Obduktion der CLP und PCI behandelten Tiere, dass eine Peritonitis mit Gewebeveränderungen an Organen wie Kolon, Leber sowie Milz entwickelt wurde. Die Sepsis ist eine wesentliche Ursache für ein akutes Nierenversagen (Bonventre 2007). Im septischen Gewebe sind u. a. Minderperfusion und Hypoxie charakteristisch, auf das die Nieren empfindlich reagieren (Epstein et al. 1987, Cohen 2002). Die Transkriptionsfaktoren HIF-1/2 α sind von Bedeutung in der zellulären Adaptation an hypoxische Verhältnisse im Gewebe und involviert in die biologischen Prozesse wie das Überleben, die Erythropoese oder den Energiestoffwechsel (Haase 2006, Rosenberger et al. 2006). In *in vitro*-Studien wurde die Regulation der HIF-Stabilität über die MORG1 assoziierte PHD3-Aktivität nachgewiesen (Hopfer et al. 2006). Unsere *real time* PCR-Daten zeigten eine reduzierte mRNS-Expression von *Morg1* durch die sham-CLP-OP im Nierengewebe der Wildtypiere verglichen mit den NaCl behandelten Wildtypieren. Das war ähnlich den Ergebnissen von Miyazawa et al. und wurde auf die zusätzliche Belastung der Tiere, die Anästhesie und den chirurgischen Eingriff, zurückgeführt (Miyazawa et al. 2002). In den *Morg1*^{+/-}-Mäusen war die renale Expression der *Morg1*-mRNS signifikant geringer in den NaCl behandelten sowie in den sham-CLP operierten Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypieren. Diese Effekte konnten wir auch in der Expression der mRNS von *Hif-1 α* , *Hif-2 α* und *Phd3* im Nierengewebe beobachten. Entgegen unserer Vermutung waren die basalen Expressionen der mRNS von *Hif-1/2 α* signifikant geringer in den Nieren der NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypieren. Die mRNS-Expression von *Phd3* entsprach dem Expressionsmuster von *Morg1*-

mRNS in den NaCl behandelten Tieren beider Maus-Genotypen, welches ähnlich war zu den Ergebnissen von Hammerschmidt et al. (Hammerschmidt et al. 2009). Unsere Daten zeigten außerdem ein gleichgerichtetes Expressionsmuster von *Phd3*- und *Morg1*-mRNS im Nierengewebe nach PCI- und Endotoxämie-Induktion. In den Wildtyptieren waren die Expressionen von *Phd3*- und *Morg1*-mRNS verringert nach PCI- und LPS-Behandlung, wohingegen in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen die Expression nach Sepsis-Induktion via PCI anstieg und nach LPS-Applikation keine Veränderung zeigte. Gegensätzlich verlaufende mRNS-Expressionen von *Phd3* und *Morg1* konnten wir in den sham-CLP und CLP behandelten Mäusen beider Genotypen detektieren. Weiterhin konnten wir erhöhte mRNS-Expressionen von *Hif-1α* und *Phd3* in den Nieren der sham-CLP behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen detektieren im Vergleich mit den entsprechenden Wildtyptieren. Parallel dazu wurde kein Unterschied in der Expression von *Hif-2α*-mRNS nach sham-CLP-OP zwischen den beiden Maus-Genotypen beobachtet. Diese Daten korrelierten nicht mit den Ergebnissen von Appelhoff et al. und Bishop et al., die PHD3 in stärkerer Beziehung mit HIF-2α zeigten (Appelhoff et al. 2004, Bishop et al. 2008). Unsere IHC-Analysen an Nierengewebeschnitten zeigten eine geringere Expression von MORG1 in den NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen verglichen mit den entsprechenden Wildtyptieren, dass entsprechend zu unseren mRNS-Daten war. Entgegengesetzt dazu waren allerdings die Daten der Expression von MORG1 im Nierengewebe nach sham-CLP-OP. Die Ergebnisse der IHC zeigten eine starke Akkumulation von MORG1 in den sham-CLP behandelten *Morg1*^{+/-}-Tieren im Vergleich zu den sham-CLP behandelten Wildtyptieren. Weiterhin konnten wir eine höhere HIF-1α-Expression in den Nieren der NaCl behandelten *Morg1*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyptieren detektieren, dass mit den Daten von Hammerschmidt et al. korrelierte (Hammerschmidt et al. 2009). Das unterstützte die Möglichkeit für unsere These, dass die reduzierte MORG1-Expression assoziiert ist mit der Erhöhung von HIF-1/2α. Die Protein-Expression von HIF-2α war hingegen unter unseren experimentellen Bedingungen gegensätzlich zu unseren Ergebnissen der HIF-1α-Expression.

Dieses renale Expressionsmuster von HIF-1 α und HIF-2 α wurde in der Literatur in PHD inhibierten Wildtypmatten gezeigt (Wang et al. 2012). In unserer Arbeit konnten wir demonstrieren, dass die gesteigerte HIF-1 α -Expression mit der Expression von MORG1 und PHD3 negativ korreliert war. Diese Daten waren ähnlich zu den Ergebnissen von Bondeva et al., die in renalen Zellkulturen die Koexistenz von MORG1 und PHD3 sowie die MORG1 vermittelte Stabilisierung von HIF-1/2 α via PHD3 beobachteten (Bondeva et al. 2013). Nach Sepsis-Induktion durch CLP oder Endotoxämie konnten wir zudem eine verringerte mRNA-Expression von *Morg1* in den Wildtypmatten detektieren, wohingegen die Expression in den *Morg1*^{+/-}-Matten unverändert blieb, verglichen mit den entsprechenden Kontrollmatten. Die IHC-Daten zeigten keine Verringerung der Protein-Expression von MORG1 im Nierengewebe der septischen Wildtypmatten und sogar eine erhöhte Akkumulation von MORG1 nach LPS-Gabe. Im Unterschied dazu war die Expression von MORG1 in den *Morg1*^{+/-}-Matten signifikant geringer nach CLP-OP, die offensichtlich einen negativen Einfluss auf die Protein-Expression von MORG1 hatte. Obwohl das Zusammenspiel von MORG1 und PHD3 noch nicht vollständig verstanden ist, deuten diese Daten darauf hin, dass die Expression von MORG1 und PHD3 auch unter septischen Bedingungen korrelieren. Die Daten von Hopfer et al. zeigten zumindest, dass die MORG1-Expression verbunden ist mit der Expression von PHD3 (Hopfer et al. 2006, Hammerschmidt et al. 2009). Das Endotoxin LPS erhöhte tendenziell die Expression von *Hif-1/2 α* -mRNA in den Wildtyp- und *Morg1*^{+/-}-Matten. In den beiden Sepsis-Modellen konnte dieses Expressionsmuster nur teilweise detektiert werden. Auf der Proteinebene wurde eine Akkumulation von HIF-1/2 α in dem Nierengewebe beider Maus-Genotypen in den CLP oder PCI Modellen gefunden. Die Applikation mit LPS hatte dagegen keinen Einfluss auf die Expression von HIF-1/2 α , dass kontrovers war zu den Befunden in vorhergehenden Arbeiten. In früheren Studien wurde eine LPS induzierte Erhöhung von HIF-1 α gefunden (Peyssonnaud et al. 2007, Jantsch et al. 2011).

In unseren Analysen zur Basalexpression der Zielgene von HIF-1/2 α konnten wir eine höhere Expression der mRNA von *Epo* in den NaCl

behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyptieren zeigen. Dieser Befund bestätigt einen Teil der Ergebnisse von Hammerschmidt et al. (Hopfer et al. 2006, Hammerschmidt et al. 2009). Kontrovers zu den Ergebnissen von Haase und Warnecke et al. (Warnecke et al. 2004, Haase 2006), die eine EPO vermittelte HIF-2 α -Regulation beobachteten, zeigten unsere Daten eine Hochregulation der Expression der *Epo*-mRNS bei einer erhöhten Protein-Akkumulation von HIF-1 α und nicht HIF-2 α im Gesamtnierengewebe. In unseren Untersuchungen wurde in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen eine Verringerung der *Glut1*- und VEGF-Expression in NaCl behandelten Mäusen unter basalen Konditionen beobachtet. Ginouves et al. konnten unter langanhaltender Hypoxie eine negative Regulation von HIF-1/2 α demonstrieren, indem sie die HIF-1/2 α geförderte Transkription von PHDs zeigten (Ginouves et al. 2008). Ob unsere Ergebnisse aus diesem Hypoxie vermittelten Prozess resultierten oder/und der bakterielle Insult sowie die Inflammation einen Einfluss hatten, konnten wir mit unseren Daten nicht beantworten. Dazu sind weitere Untersuchungen nötig. In der Literatur wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen erhöhte mRNS-Expressionen von *Glut1* und *Epo* beschrieben, die durch eine Hypoxie vermittelt wurden (Takagi et al. 1998, Bunn 2013, Zapata-Morales et al. 2014). Unsere Resultate zeigten kontrovers dazu 24h nach Induktion einer PCI-Sepsis und Endotoxämie keine Hochregulierung der Expressionen von *Epo*- und *Glut1*-mRNS in den *Morg1^{+/-}*- oder Wildtypmäusen. Die involvierenden Mechanismen, die zu diesem Ergebnis führten, sind unbekannt. Allein in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen waren 24h nach CLP-Behandlung die mRNS-Expressionen von *Epo* und *Glut1* gering erhöht. Wie oben bereits beschrieben wurde, schien der operative Eingriff einen Effekt zu haben, denn selbst nach PCI, welches auch ein polymikrobielles Sepsis-Modell ist, sank die *Epo*-mRNS-Expression in beiden Maus-Genotypen. Das Expressionsmuster von VEGF nach Sepsis- und Endotoxämie-Induktion war different zu dem von *Epo*- und *Glut1*-mRNS in den *Morg1^{+/-}*- und Wildtypmäusen. Die basalen Levels von VEGF im Blutplasma nach sham-CLP-OP waren ohne signifikanten Unterschied zwischen den *Morg1^{+/-}*- und Wildtyptieren. Jedoch konnten wir einen Anstieg der VEGF-Konzentrationen in

den sham-CLP behandelten Mäusen verglichen mit den NaCl behandelten Tieren beobachten. Unsere Ergebnisse zeigten außerdem, dass unter septischen und endotoxämischen Konditionen die Konzentrationen von VEGF in allen drei Behandlungsmodellen in beiden Maus-Genotypen anstiegen mit der einen Ausnahme in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen nach CLP-Behandlung. Diese Befunde bestätigen teilweise die Daten der Literatur. Einerseits ist bekannt, dass die Expression von *Vegf*-mRNS von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen reguliert wird (Thangarajah et al. 2009). Andererseits beschrieben Peyssonnaud et al., dass VEGF auch HIF-unabhängig exprimiert werden kann (Peyssonnaud et al. 2007). Welche Mechanismen unter unseren experimentellen Bedingungen zu der erhöhten Expression von VEGF führten, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Jeong et al. konnten in einem experimentellen Modell der Sepsis eine positive Wirkung auf das Überleben zeigen, wenn VEGF gezielt blockiert wurde (Jeong et al. 2013).

In der Literatur werden verschiedene Ursachen, die zu einem ANV führen, beschrieben. Einige Untersuchungen zeigten morphologische Veränderungen des Nierengewebes aufgrund einer Ischämie vermittelten akuten tubulären Nekrose (Liano und Pascual 1996, Mehta et al. 2004) oder eine Inflammation vermittelte intestinale Fibrose (Bonventre und Zuk 2004, Schrier et al. 2004). Der Einfluss von HIF-1 α in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen auf das Sepsis bzw. Endotoxämie assoziierte ANV im Vergleich zu den Wildtypmäusen wurde bislang nicht untersucht. In den experimentellen Behandlungen sollten die Unterschiede zwischen den Maus-Genotypen deutlicher hervortreten, daher wurde keine Volumentherapie durch zusätzliche Applikation von einer 0,9%igen NaCl-Lösung angewendet. Die Volumentherapie ist ein Bestandteil der Behandlung der kritisch-kranken Patienten. In Studien von Bagshaw und Bellomo sowie Zhang et al. wurde jedoch die Volumentherapie kritisch betrachtet, hinsichtlich der Zeit und Menge der Flüssigkeitsgabe, die einen Einfluss auf den Verlauf der septischen Erkrankung hat (Bagshaw und Bellomo 2007, Zhang et al. 2013). Unsere Daten der PAS-Reaktion zeigten in *Morg1^{+/-}*-Mäusen mildere morphologische Veränderungen im Nierengewebe nach Sepsis-Induktion verglichen mit den septischen Wildtyptieren, die nach CLP-OP signifikant

waren. In den Gewebeschnitten der septischen Mausnieren waren im kortikalen Bereich Tubuluszellen zu sehen, die ihren Zell–Zell–Kontakt verloren und diese im Lumen der Tubuli abgelöst waren, das mit der Schmälerung des Bürstensaums einherging. Der Verlust des Bürstensaums und die damit verbundene Vakuolenbildung sind Befunde, die die in der Literatur angegebenen Daten der Pathogenese des ANV und des septischen ANV bestätigen (Klenzak und Himmelfarb 2005, Doi et al. 2009a). Eine wichtige Beobachtung in unseren Daten war, dass in den *Morg1^{+/-}*–Mäusen weniger Vakuolenbildung und ein geringerer Verlust des Bürstensaums 24h nach der Sepsis–Induktion via CLP und PCI detektiert wurde im Vergleich zu den entsprechenden Sepsis behandelten Wildtyptieren. Damit konnten wir die Ergebnisse von Wang et al. bestätigen, die im Modell Ischämie/Reperfusion eine verbesserte Nierenmorphologie in Ratten aufgrund der Inhibierung von PHD3 zeigten (Wang et al. 2012). Die Beziehung von MORG1 und HIF–1 α in der Entstehung der morphologischen Veränderung aufgrund des septischen ANV wurde bisher noch nicht gezeigt. Unter unseren experimentellen Konditionen verursachte die Endotoxämie via LPS keine Veränderung im Nierengewebe, dass kontrovers zu den Angaben von Miyazaki et al. war (Miyazaki et al. 2012).

In gesunden Geweben ist der programmierte Zelltod streng reguliert und läuft nach charakteristischem Muster ab (Linkermann et al. 2012). Durch die Hemmung der HIF–Degradation via PHD–Inhibierung konnten Bernhardt et al. eine protektive Wirkung gegenüber ischämischen Gewebeschäden und Apoptose zeigen (Bernhardt et al. 2006a). Unter septischen Bedingungen kann der Apoptose–Mechanismus vorschnell erfolgen aufgrund der immunologischen Hyperantwort (Oberholzer et al. 2001). Der Einfluss der Reduktion von MORG1 auf die renalen apoptotischen Veränderungen in der Sepsis wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Unsere Daten der TUNEL–Analyse zeigten eine erhöhte Apoptose in den *Morg1^{+/-}*–Mäusen nur nach PCI–Behandlung und dagegen in den Wildtyptieren in beiden Sepsis–Modellen. Das Endotoxin LPS scheint abnorm zu einer Verminderung der apoptotischen Vorgänge in der Niere in beiden Maus–Genotypen zu führen. Diese nicht schlüssigen

Ergebnisse demonstrieren, dass der TUNEL-Assay trotz seiner einfachen Durchführung einer kritischeren Auswertung der IHC gefärbten Nierenschnitte bedarf, auf das die Arbeit von Labat-Moleur et al. hinweist (Labat-Moleur et al. 1998). Aus diesem Grund wurde eine zweite Methode der Apoptose-Analyse herangezogen. Die aktive Caspase 3 war nach Sepsis-Induktion sowie LPS-Gabe signifikant erhöht in beiden Maus-Genotypen im Vergleich zu den nicht-septischen bzw. NaCl behandelten Tieren. Dennoch waren in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen signifikant im CLP- sowie LPS-Modell und tendenziell nach PCI-Behandlung weniger Apoptose zu detektieren. Unter basalen Konditionen war der aktive Caspase 3-Level in den NaCl und den sham-CLP behandelten *Morg1^{+/-}*-Mäusen geringer verglichen mit den entsprechenden Wildtypen. Die MORG1-Runterregulation korrelierte demnach mit der Reduktion der Apoptose in dem Gewebe der Nieren.

In Übereinstimmung mit unseren Befunden der Apoptose-Analyse, konnten wir in den Experimenten eine Protektion gegen die Infiltration von CD3⁺-T-Zellen in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen in allen drei Modellen beobachten. In dieser Arbeit wurde erstmalig demonstriert, welche Auswirkung die Reduktion der MORG1-Expression auf die vermehrte Infiltration von T-Zellen nach Induktion einer Sepsis oder einer Endotoxämie hat. Die IHC-Daten zeigten eine tendenziell gesteigerte Infiltration nach CLP-OP und eine signifikante Erhöhung der Infiltration der T-Zellen in das Nierengewebe der Wildtypen nach PCI- und LPS-Applikation. Dieser Anstieg der Infiltration von CD3⁺-T-Zellen blieb im Gewebe der *Morg1^{+/-}*-Mausnieren 24h nach Sepsis- und Endotoxämie-Induktion aus. Diese Daten reflektieren jedoch nicht die systemische Inflammation, die anhand der Level von inflammatorischen Zytokinen IL-6, *Tnfa*, IL-10 bzw. INF γ im Blutplasma bzw. Vollblut in dieser Arbeit ermittelt wurden. Aus experimentell bedingten Gegebenheiten wurde diese Analyse lediglich an Tieren begrenzter Anzahl durchgeführt. In der Literatur wurde die dysregulierte Inflammation mit einer hyper- gefolgt von einer hypodynamischen Inflammation beschrieben, welche durch die Erhöhung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet ist (Wahl 2003). Unsere Daten zeigten einen Anstieg des

proinflammatorischen IL-6 ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Maus-Genotypen, wohingegen die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und INF γ im Blutplasma keine Veränderungen nach Sepsis- oder Endotoxämie-Induktion zeigten. Lediglich nach LPS-Gabe konnte eine Erhöhung der Blutplasmawerte von INF γ in beiden Maus-Genotypen gezeigt werden. Weiterhin konnten wir in dieser Arbeit nach allen drei Modellen die hochregulierte Expression von *Tnfa*-mRNS in einer zeitabhängigen Weise im Vollblut demonstrieren, wobei in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen eine tendenziell geringere Gen-Expression von *Tnfa* im Vergleich zu den Wildtyptieren detektiert wurde. Die Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und *Tnfa* der hyperinflammatorischen Phase der Sepsis bei unveränderten antiinflammatorischen Zytokinen IL-10 und INF γ der Hypoinflammation wurde auch von Riedemann et al. beschrieben (Riedemann et al. 2003). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Induktion von HIF-1 α die Produktion von TNF α in Makrophagen erhöht und einen negativen Einfluss auf den Verlauf einer LPS induzierten Endotoxämie hat (Peyssonnaud et al. 2007). Unsere Daten der *Tnfa*-Expression im Nierengewebe zeigten, dass das relative mRNS-Niveau von *Tnfa* in allen drei Modellen 24h nach den Behandlungen in beiden Maus-Genotypen stieg. Dabei wurde jedoch tendenziell weniger *Tnfa* in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen detektiert verglichen mit den Wildtyptieren. Interessanterweise war nach der sham-CLP-OP die Gen-Expression von *Tnfa* in den Wildtypmäusen erhöht, jedoch nicht in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen. Der scheinbar bessere Zustand der *Morg1^{+/-}*-Mäuse nach dem chirurgischen sham-Eingriff wurde in unseren Experimenten deutlich. Dennoch zeigten unsere IHC-Daten eine höhere Protein-Akkumulation von TNF α im tubulären Nierengewebe der *Morg1^{+/-}*-Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyptieren nach der sham-CLP-OP, CLP-OP und PCI-Applikation. Möglicherweise führte die posttranslationelle Modifikation 24h nach diesen Behandlungen zu einer Stabilisierung des Proteins, oder/und die Halbwertszeit von TNF α -Protein war im Nierengewebe verlängert. In der Literatur wurde in HIF-1 α deletierten Makrophagen unter hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen eine HIF-1 α -unabhängige und -abhängige Induktion des NF- κ B-Signalwegs

gezeigt, der mit der Erhöhung der TNF α -Expression verbunden war (Peyssonnaud et al. 2007). Zudem konnten Lahat et al. in isolierten Maus-Makrophagen eine Hypoxie vermittelte Degradation von TNF α bei unveränderter mRNA-Expression beobachten (Lahat et al. 2008). Schließlich konnten unsere Daten zeigen, dass die Infiltration der T-Zellen im Nierengewebe in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen verringert und mit der verminderten Expression von *Tnfa*-mRNA im Gesamtnierengewebe korreliert war. In früheren Analysen zeigten Bauer et al. die Vermittlung der Expression von u. a. TNF α durch immunkompetente Zellen wie T-Zellen (Bauer et al. 2006). Zudem wurde die Induktion einer renalen Schädigung durch TNF α demonstriert (Bone 1991, Kohan 1994, Thijs und Thijs 1998). Diese Beobachtungen könnten ein Indiz sein für die von uns ermittelten Daten, die mit der geringeren Nierenschädigung in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen korreliert waren im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyptieren nach Sepsis-Induktion.

Die Sepsis induzierte Nierendysfunktion aufgrund einer Zellfunktionsstörung oder/und eines Zellverlusts durch Nekrose sowie Apoptose wurde bereits früher beschrieben (Cobb et al. 2000, Klenzak und Himmelfarb 2005). Um die Wirkung von dem reduzierten MORG1 bzw. aktivierten HIF-1 α auf die Funktion der Nieren in Sepsis und Endotoxämie zu bewerten, wurden parallel zu der renale Morphologie verschiedene Parameter der Nierenfunktion, Kreatinin, BUN und NGAL im Blutplasma sowie ACR im Urin, gemessen. Auf ein akutes Nierenversagen deuten erhöhtes Serum-Kreatinin und verminderte Urinausscheidung hin (Klenzak und Himmelfarb 2005). In unseren Untersuchungen wurde eine teilweise signifikante Erhöhung der Kreatinin-Konzentration im Blutplasma nach CLP-Sepsis-Induktion und LPS-Applikation gefunden sowie eine starke Verminderung der Urinabgabe in allen drei Behandlungsmodellen beobachtet. Kreatinin und BUN sind beschränkte Nierenfunktionsparameter bezüglich der Varianz aufgrund der Muskelmasse oder/und des Alters (Perrone et al. 1992, Edelstein 2008), gerade auch in Mäusen. Aus diesem Grund wurden in unseren Untersuchungen gleichaltrige und ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Überdies werden diese Parameter in der Literatur häufig genutzt. Im Gegensatz zu Kreatinin und BUN

wird NGAL in der Analyse der frühen Nierenschädigung verwendet (Coca et al. 2008). Die Messungen der drei Parameter zeigten in unseren Untersuchungen bereits nach der sham-CLP-OP eine Verschlechterung der Nierenfunktion im Vergleich zu den NaCl behandelten Tieren beider Maus-Genotypen. Nach der Sepsis- und Endotoxämie-Induktion war die Nierenfunktion weiter verschlechtert in beiden Maus-Genotypen mit ähnlichem Ausmaß. Die Ausscheidung von Albumin in Relation zu Kreatinin durch die MORG1-Suppression war tendenziell geringer in NaCl behandelten Tieren und 24h nach der Sepsis-Induktion durch PCI bzw. LPS-Gabe verglichen mit den entsprechenden Wildtyptieren. In den CLP operierten *Morg1^{+/-}*-Mäusen wurde eine tendenziell höhere ACR messbar im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyptieren. Unter unseren experimentellen Bedingungen bzw. durch die Reduktion von MORG1 vermittelter HIF-1 α -Stabilisierung konnten wir die Ergebnisse von Wang et al. nicht bestätigen. Im Rattenmodell mit der Inhibierung von PHD3, die verbunden war mit der erhöhten HIF-1/2 α -Stabilität, konnten Wang et al. eine verbesserte Nierenfunktion 24h nach Ischämie/Reperfusion zeigen (Wang et al. 2012). Die starke Erhöhung von NGAL ist auf eine vermehrte Abgabe durch Tubuluszellen in den Urin und zusätzlich über andere Gewebe wie Magen-Darm-Trakt in das Blut, bei einem akuten Nierenversagen zurückzuführen. Die Inflammation selbst und die dadurch bedingte akute Nierenschädigung fördern die Freisetzung von NGAL mit Erhöhung der Konzentrationen im Blut und Urin (Bruck 2009).

Die systemische Auswirkung der Reduktion von MORG1 bzw. die HIF-1/2 α -Aktivierung auf die Überlebensrate bei Sepsis wurde über 72 Stunden analysiert. Bisher wurden keine Studien zum Überleben von *Morg1^{+/-}*-Mäusen nach Sepsis- bzw. Endotoxämie-Induktion gemacht. Unsere Daten zeigten, dass die Suppression der MORG1-Expression mit der gesteigerten Letalität der septischen Tiere korrelierte verglichen mit den entsprechenden Wildtypmäusen. Zum Zeitpunkt 72h nach der Sepsis-Induktion verstarben mehr *Morg1^{+/-}*-Mäuse den Behandlungen als Wildtypiere. Die protektive Wirkung im Nierengewebe der *Morg1^{+/-}*-Tiere aufgrund der Reduktion von MORG1 oder/und Aktivierung von HIF-1/2 α trifft auf die systemische Wirtslage offensichtlich nicht zu. Unsere

Ergebnisse der Überlebenskinetik zeigten einen negativen Effekt von der HIF-1/2 α -Stabilisierung in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen nach Sepsis-Induktion. Ähnliche Effekte wurden in PHD3- und HIF-1 α -*knockout*-Tieren gefunden (Thiel et al. 2007, Kiss et al. 2012, Georgiev et al. 2012). Kiss et al. zeigten, dass nach CLP- und LPS-Behandlung das Überleben in PHD3-*knockout*-Mäusen verkürzt war aufgrund einer überschwelenden Inflammation sowie Organschädigung in der Lunge und den Nieren (Kiss et al. 2012). In dieser Arbeit konnten 24h nach den Behandlungen jedoch keine übersteigerte Inflammation und zudem weniger Nierenschäden in den *Morg1^{+/-}*-Mäusen detektiert werden. Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass Sepsis mit der Beeinträchtigung mehrere Organe assoziiert ist und überdies das septische ANV zusätzlich zu komplexen extrarenalen Störungen verschiedener Organsysteme führen kann (Russell et al. 2000, Mehta et al. 2011). Unter unseren experimentellen Bedingungen ist die Beteiligung andere Organe an der verringerten Überlebenszeit der *Morg1^{+/-}*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäußen wahrscheinlich. Zudem können MORG1 induzierte Mechanismen entsprechend einen Einfluss haben, denn die Bindung von MORG1 mit anderen Komponenten vom MAPK-Signalweg ist bekannt (Vomastek et al. 2004). Um in dieser Richtung Antworten zu finden, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Die LPS-Injektion beeinflusste nicht die Überlebensrate der Tiere weder in den *Morg1^{+/-}*- noch in den Wildtypmäusen.

Hiermit können wir zusammenfassen, dass die Inhibierung von MORG1 oder die HIF-1/2 α -Aktivierung keinen Vorteil für das Überleben unter septischen Konditionen hat, wenn auch renoprotektive Effekte gefunden wurden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Befunde aufzuklären und auch den Einfluss von MORG1 und HIF-1/2 α in anderen Organschädigungen durch Sepsis zu prüfen.

6 Schlussfolgerung und Aussicht

Das Hauptziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zu der Rolle von MORG1 und HIF-1 α in der Sepsis induzierten Nierenschädigung. Dabei sollte der Einfluss der erhöhten HIF-1 α -Stabilität aufgrund der Runterregulation der MORG1-Expression in den heterozygoten *Morg1*-Mäusen analysiert und mit den Wildtyptieren verglichen werden. Im Rahmen dessen wurden die in der Zielstellung gefassten Fragen wie folgt geklärt:

- Zwei verschiedene Sepsis-Modelle, CLP und PCI, sowie ein Modell der Endotoxämie durch LPS-Gabe sollten klären, welches dieser Modelle den stärksten Effekt im Sepsis assoziierten akuten Nierenversagen zeigt, wenn MORG1 herunterreguliert bzw. die HIF-1 α -Expression erhöht ist. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die CLP- und die PCI-Behandlung zu ähnlich starken Effekten in den Nieren der Versuchstiere führte. Die starken Veränderungen wurden in den Untersuchungen zur renalen Morphologie, der Apoptose, der Infiltration der T-Zellen und der Nierenfunktion in den *Morg1*^{+/-}- und Wildtypmäusen beobachtet. Dabei war das PCI-Modell für die Untersuchung ohne den Einfluss eines chirurgischen Eingriffs ein sehr guter Vergleich zum klinisch relevanteren CLP-Modell gewesen. Um die Effekte detaillierter zu analysieren, könnten Untersuchungen eines früheren oder späteren Zeitpunkt interessant sein (Wichterman et al. 1980).
- Die gesteigerte HIF-1/2 α -Expression nach Sepsis-Induktion korrelierte negativ mit der Expression von MORG1 und PHD3 im Nierengewebe beider Maus-Genotypen, wohingegen die Protein-Expression von HIF-1/2 α nicht durch Endotoxämie verändert war. Die Beziehung von MORG1 und PHD3 ist noch nicht vollständig verstanden. Doch die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von MORG1 und PHD3 auch unter septischen Bedingungen gekoppelt ist. Die Expression bekannter Transkriptionsziele von HIF-1/2 α wie *Epo* und *Glut1* war nur nach Sepsis-Induktion durch CLP in den *Morg1*^{+/-}-Mäusen erhöht. Ob dies aus einem Hypoxie vermittelten Prozess oder/und dem bakteriellen Insult sowie der Inflammation resultierte, konnten wir mit den vorliegenden Daten nicht

beantworten. Dagegen provozierten Sepsis und Endotoxämie einen Konzentrationsanstieg von VEGF in allen drei Behandlungsmodellen sowohl in den *Morg1^{+/-}*– als auch in den Wildtypmäusen. Welche zugrunde liegenden Mechanismen dazu führten oder ob andere MORG1–abhängigen Gene mehr in der Sepsis involviert sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

- Die MORG1–Herunterregulation bzw. die HIF–1/2 α –Stabilisierung vermitteln protektive Wirkung in der Niere und verbessern nekrotische und apoptotische Vorgänge 24h nach beiden Sepsis–Induktionen bzw. LPS–Applikation.
- Die Reduktion von MORG1 bzw. der erhöhten Stabilität von HIF–1/2 α auf die systemische Inflammation (Zytokine im Blutplasma) war unter diesen Versuchsbedingungen ohne Einfluss und z. T. kontrovers zur Literatur. Dagegen waren die *Morg1^{+/-}*–Mäuse geschützt vor der Infiltration der CD3⁺–T–Zellen in beiden Sepsis–Modellen und Endotoxämie im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyptieren.
- Die Nierenfunktion war aufgrund der Sepsis– und Endotoxämie–Induktion in beiden Maus–Genotypen verschlechtert, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den *Morg1^{+/-}*– und den Wildtypmäusen.
- Die Reduktion der MORG1–Expression bzw. HIF–1/2 α –Stabilisierung auf die Überlebensrate in zwei Sepsis–Modellen über 72h zeigte kontrovers zu den anderen Ergebnissen eine negative, systemische Auswirkung. Die Endotoxin–Applikation mit LPS zeigte dagegen keine Veränderungen in der Überlebensrate.

Die protektive Wirkung des stabilisierten HIF–1 α aufgrund der PHD3–Verminderung durch die MORG1–Herabregulierung war beschränkt auf das Nierengewebe in der Sepsis bzw. Endotoxämie. Dennoch deuten unsere Daten daraufhin, dass die beobachteten positive Effekte aus der Runterregulation der MORG1–Expression resultieren und nicht vorrangig durch das aktivierte HIF–1 α assoziiert waren. In welcher Form MORG1 eine Rolle beim Überleben nach Sepsis–Induktion spielt oder ob andere Mechanismen primär zum Versterben führten, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Da das

Krankheitsbild einer Sepsis stark durch Komorbiditäten beeinflusst wird, sind Untersuchungen mit vorgeschädigter Niere interessant. Dazu wurden bereits Vorversuche durchgeführt, wobei den Versuchstieren mit Folsäure eine Nierenschädigung mit veränderter Morphologie und Funktion induziert werden konnte. Dieser Ansatz wird in weiteren Untersuchungen bereits verfolgt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schweregrade der Sepsis.	2
Abbildung 2:	Der Makro– und mikroskopische Aufbau einer humanen Niere.	8
Abbildung 3:	Modell der Beziehung zwischen MORG1, PHD3 und HIF–1 α .	13
Abbildung 4:	Repräsentative Bilder einer gesunden und einer septischen Maus.	21
Abbildung 5:	Beurteilung des äußeren Erscheinungsbilds via CSS.	35
Abbildung 6:	Analyse der Protein–Expression von MORG1 im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen.	38
Abbildung 7:	Analyse der mRNS–Expression von <i>Morg1</i> via <i>real time</i> PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS.	39
Abbildung 8:	Analyse der Protein–Expression von HIF–1 α im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen.	42
Abbildung 9:	Analyse der mRNS–Expression von <i>Hif–1α</i> via <i>real time</i> PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS.	43
Abbildung 10:	Analyse der Protein–Expression von HIF–2 α im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen.	46
Abbildung 11:	Analyse der mRNS–Expression von <i>Hif–2α</i> via <i>real time</i> PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS.	47
Abbildung 12:	Analyse der Protein–Expression von PHD3 im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen.	50
Abbildung 13:	Analyse der mRNS–Expression von <i>Phd3</i> via <i>real time</i> PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS.	51
Abbildung 14:	Analyse der mRNS–Expression von <i>Epo</i> via <i>real time</i> PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS.	53
Abbildung 15:	Analyse der mRNS–Expression von <i>Glut1</i> via <i>real time</i> PCR im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS.	54
Abbildung 16:	Analyse der Protein–Expression von VEGF im Blutplasma 24h nach den Behandlungen CLP, PCI und LPS.	55
Abbildung 17:	Charakterisierung der pathologischen Veränderungen im Nierengewebe 24h nach den Behandlungen.	59
Abbildung 18:	Bewertung der apoptotischen Veränderungen via TUNEL.	61
Abbildung 19:	IHC–Quantifizierung der aktiven Caspase 3 durch Auszählen der Spots per Areal.	62
Abbildung 20:	Apoptose–Analyse via IHC–Detektion der aktiven Caspase 3.	63
Abbildung 21:	Analyse der Zytokine im Vollblut 24h nach Sepsis–Induktion oder LPS–Gabe.	66
Abbildung 22:	Analyse der Expression von TNF α im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen.	68
Abbildung 23:	Analyse der Protein–Expression von CD3 ⁺ –T–Zellen im Gesamtnierengewebe 24h nach den Behandlungen.	71
Abbildung 24:	Analyse des Kreatinin–Spiegels im Blutplasma 24h nach Sepsis–Induktion bzw. LPS–Applikation.	72
Abbildung 25:	Analyse von BUN 24h nach Sepsis–Induktion bzw. LPS–Applikation.	73
Abbildung 26:	Analyse von NGAL im Blutplasma 24h nach Sepsis–Induktion bzw. LPS–Applikation.	74

Abbildung 27: Analyse von ACR im Urin 24h nach Sepsis-Induktion bzw. LPS-Applikation.	75
Abbildung 28: Studien zum Überleben der Sepsis-Modelle CLP, PCI und der LPS-Behandlung über 72 Stunden.	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Tierexperimentelle Versuchsgruppen.	18
Tabelle 2:	Versuchsgruppen der Überlebensstudien.	18
Tabelle 3:	Kriterien zur Beurteilung des klinischen Schweregrads (CSS) der Versuchstiere.	22
Tabelle 4:	<i>Real time</i> PCR-Programm.	29

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383 (6603):787-793.
- Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH, Lujan JJ, Hasko G, Csoka B, Selmecezy Z, Nemeth ZH. 2009. HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol Hung*, 96 (1):19-28.
- Adnet JJ, Pinteaux A, Pousse G, Caulet T. 1972. [A simple technic for ultrastructural detection of PAS positive connective fibrinoids]. *Pathol Biol (Paris)*, 20 (19):829-833.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29 (7):1303-1310.
- Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM. 2004. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, 279 (37):38458-38465.
- Aprelikova O, Chandramouli GV, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK, Linehan WM, Barrett JC. 2004. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem*, 92 (3):491-501.
- Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM. 1996. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (23):12969-12973.
- Bagshaw SM, Bellomo R. 2007. The influence of volume management on outcome. *Curr Opin Crit Care*, 13 (5):541-548.
- Bagshaw SM, George C, Bellomo R, Committee ADM. 2008. Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Crit Care*, 12 (2):R47.
- Bagshaw SM, Lapinsky S, Dial S, Arabi Y, Dodek P, Wood G, Ellis P, Guzman J, Marshall J, Parrillo JE, Skrobik Y, Kumar A. 2009. Acute kidney injury in septic shock: clinical outcomes and impact of duration of hypotension prior to initiation of antimicrobial therapy. *Intensive Care Med*, 35 (5):871-881.
- Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Oudemans-van Straaten HM, Ronco C, Kellum JA. 2007. Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2 (3):431-439.
- Balaban RS, Sylvia AL. 1981. Spectrophotometric monitoring of O₂ delivery to the exposed rat kidney. *Am J Physiol*, 241 (3):F257-262.
- Balk RA, Bone RC. 1989. The septic syndrome. Definition and clinical implications. *Crit Care Clin*, 5 (1):1-8.
- Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. 2006. [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist*, 55 (8):835-845.
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (16):9237-9242.
- Bellomo R, Wan L, Langenberg C, May C. 2008. Septic acute kidney injury: new concepts. *Nephron Exp Nephrol*, 109 (4):e95-100.
- Berg RM, Moller K, Bailey DM. 2011. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 (7):1532-1544.
- Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR. 1999. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci*, 11 (12):4159-4170.

- Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR. 2000. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol*, 48 (3):285-296.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr. 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344 (10):699-709.
- Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, Munchenhagen PM, Grone HJ, Frei U, Warnecke C, Bachmann S, Wiesener MS, Willam C, Eckardt KU. 2006a. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int*, 69 (1):114-122.
- Bernhardt WM, Campean V, Kany S, Jurgensen JS, Weidemann A, Warnecke C, Arend M, Klaus S, Gunzler V, Amann K, Willam C, Wiesener MS, Eckardt KU. 2006b. Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 17 (7):1970-1978.
- Bianchi ME. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 81 (1):1-5.
- Bishop T, Gallagher D, Pascual A, Lygate CA, de Bono JP, Nicholls LG, Ortega-Saenz P, Oster H, Wijeyekoon B, Sutherland AI, Grosfeld A, Aragones J, Schneider M, van Geyte K, Teixeira D, Diez-Juan A, Lopez-Barneo J, Channon KM, Maxwell PH, Pugh CW, Davies AM, Carmeliet P, Ratcliffe PJ. 2008. Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3^{-/-} mice. *Mol Cell Biol*, 28 (10):3386-3400.
- Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, Taboada F, Gandia F, Tamayo L, Collado J, Garcia-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, Lopez MJ, Caballero A, Guerra J, Alvarez B, Mayo A, Villar J, Grupo de Estudios y Analisis en Cuidados I. 2008. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care*, 12 (6):R158.
- Blouin CC, Page EL, Soucy GM, Richard DE. 2004. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood*, 103 (3):1124-1130.
- Bochud PY, Calandra T. 2003. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ*, 326 (7383):262-266.
- Bondeva T, Heinzig J, Ruhe C, Wolf G. 2013. Advanced glycated end-products affect HIF-transcriptional activity in renal cells. *Mol Endocrinol*, 27 (11):1918-1933.
- Bone RC. 1991. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med*, 115 (6):457-469.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101 (6):1644-1655.
- Bonventre JV. 2007. Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contrib Nephrol*, 156:39-46.
- Bonventre JV, Zuk A. 2004. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*, 66 (2):480-485.
- Borden KL. 2000. RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol*, 295 (5):1103-1112.
- Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. 2009. HIF at a glance. *J Cell Sci*, 122 (Pt 8):1055-1057.
- Brezis M, Rosen S. 1995. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med*, 332 (10):647-655.
- Brezis M, Rosen S, Silva P, Epstein FH. 1984. Renal ischemia: a new perspective. *Kidney Int*, 26 (4):375-383.

- Browne MK, Leslie GB. 1976. Animal models of peritonitis. *Surg Gynecol Obstet*, 143 (5):738-740.
- Bruck H. 2009. NGAL-ein neuer Marker für das akute Nierenversagen. *Der Nephrologe: Zeitschrift für Nephrologie und Hypertensiologie*.
- Brunkhorst FM, Gastmeier P, Kern W, Kruger W, Mayer K, Weimann A, Welte T, Putensen C, Werdan K, Reinhart K. 2010. [Prevention and follow-up care of sepsis. 1st revision of S2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V., DSG) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin, DIVI)]. *Internist (Berl)*, 51 (7):925-932.
- Brunkhorst FM, Engel C, Welte T, Bloos F, Stuber F, Gerlach H, Huhle G, Grond S, Bone HG, Jaschinsky U, Quintel M, Löffler M, Reinhart K, S GCNS. 2005a. Prevalence of infection in German intensive care units - Results from the German Prevalence Study. *Infection*, 33:47-48.
- Brunkhorst FM, Engel C, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller R, Rossaint R, Stueber F, Weiler N, Welte T, Löffler M, Reinhart K, S GCNS. 2005b. Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany - Results from the German Prevalence Study. *Infection*, 33:49-49.
- Budelmann G. 1969. [Hugo Schottmuller, 1867-1936. The problem of sepsis]. *Internist (Berl)*, 10 (3):92-101.
- Bulger RE. 1986. Kidney morphology: update 1985. *Toxicol Pathol*, 14 (1):13-25.
- Bunn HF. 2013. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3 (3):a011619.
- Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. 2005. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*, 4 (10):854-865.
- Capasso G, Unwin R, Rizzo M, Pica A, Giebisch G. 2002. Bicarbonate transport along the loop of Henle: molecular mechanisms and regulation. *J Nephrol*, 15 Suppl 5:S88-96.
- Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L. 2000. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*, 20 (1):402-415.
- Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. 2005. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol*, 16 (11):3365-3370.
- Cobb JP, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS. 2000. Molecular biology of multiple organ dysfunction syndrome: injury, adaptation, and apoptosis. *Surg Infect (Larchmt)*, 1 (3):207-213; discussion 214-205.
- Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. 2008. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int*, 73 (9):1008-1016.
- Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. 2000. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, 275 (33):25733-25741.
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420 (6917):885-891.
- Demidenko ZN, Blagosklonny MV. 2011. The purpose of the HIF-1/PHD feedback loop: to limit mTOR-induced HIF-1alpha. *Cell Cycle*, 10 (10):1557-1562.
- Devarajan P. 2006. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*, 17 (6):1503-1520.
- Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. 2009a. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*, 119 (10):2868-2878.

- Doi K, Yuen PS, Eisner C, Hu X, Leelahavanichkul A, Schnermann J, Star RA. 2009b. Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis. *J Am Soc Nephrol*, 20 (6):1217-1221.
- Edelstein CL. 2008. Biomarkers of acute kidney injury. *Adv Chronic Kidney Dis*, 15 (3):222-234.
- Eguchi H, Ikuta T, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. 1997. A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1 β is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem*, 272 (28):17640-17647.
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (9):4273-4278.
- Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. 1999. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J*, 18 (7):1905-1914.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-618.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107 (1):43-54.
- Epstein FH, Balaban RS, Ross BD. 1982. Redox state of cytochrome aa3 in isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol*, 243 (4):F356-363.
- Epstein FH, Brezis M, Silva P, Rosen S. 1987. Physiological and clinical implications of medullary hypoxia. *Artif Organs*, 11 (6):463-467.
- Fandrey J. 2004. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286 (6):R977-988.
- Fang H, Liu A, Sun J, Kitz A, Dirsch O, Dahmen U. 2013. Granulocyte colony stimulating factor induces lipopolysaccharide (LPS) sensitization via upregulation of LPS binding protein in rat. *PLoS One*, 8 (2):e56654.
- Fink MP. 2008. Animal models of sepsis and its complications. *Kidney Int*, 74 (8):991-993.
- Fink MP, Evans TW. 2002. Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: report from a Round Table Conference held in Brussels. *Intensive Care Med*, 28 (3):369-375.
- Fischer RP, Polk HC, Jr. 1975. Changing etiologic patterns of renal insufficiency in surgical patients. *Surg Gynecol Obstet*, 140 (1):85-86.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16 (9):4604-4613.
- Freeman RS, Hasbani DM, Lipscomb EA, Straub JA, Xie L. 2003. SM-20, EGL-9, and the EGLN family of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases. *Mol Cells*, 16 (1):1-12.
- Georgiev P, Belikoff BB, Hatfield S, Ohta A, Sitkovsky MV, Lukashev D. 2012. Genetic deletion of the HIF-1 α isoform I.1 in T cells enhances anti-bacterial immunity and improves survival in a murine peritonitis model. *Eur J Immunol*.

- Ginouves A, Ilc K, Macias N, Pouyssegur J, Berra E. 2008. PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIF α and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (12):4745-4750.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170 (1):e123-134.
- Goodwin JK, Schaer M. 1989. Septic shock. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 19 (6):1239-1258.
- Gorlach A, Bonello S. 2008. The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J*, 412 (3):e17-19.
- Green R, Giebisch G. 1984. Luminal hypotonicity: a driving force for fluid absorption from the proximal tubule. *Am J Physiol*, 246 (2 Pt 2):F167-174.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. 1998. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr*, 7 (3):205-213.
- Guillemin K, Krasnow MA. 1997. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell*, 89 (1):9-12.
- Gullo A, Iscra F, Di Capua G, Berlot G, Lucangelo U, Chierago ML, Ristagno G, Peratoner A, Fasiolo S, Consales C, De Martino G, Tufano R. 2005. Sepsis and organ dysfunction: an ongoing challenge. *Minerva Anestesiol*, 71 (11):671-699.
- Gunaratnam L, Bonventre JV. 2009. HIF in kidney disease and development. *J Am Soc Nephrol*, 20 (9):1877-1887.
- Haase D, Keiner S, Mawrin C, Wolf G. 2009. Reduced Morg1 expression in ischemic human brain. *Neurosci Lett*, 455 (1):46-50.
- Haase VH. 2006. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291 (2):F271-281.
- Haase VH. 2010. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299 (1):F1-13.
- Haase VH. 2013. Mechanisms of hypoxia responses in renal tissue. *J Am Soc Nephrol*, 24 (4):537-541.
- Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. 2011. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief*, (62):1-8.
- Hammerschmidt E, Loeffler I, Wolf G. 2009. Morg1 heterozygous mice are protected from acute renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297 (5):F1273-1287.
- Harris RL, Musher DM, Bloom K, Gathe J, Rice L, Sugarman B, Williams TW, Jr., Young EJ. 1987. Manifestations of sepsis. *Arch Intern Med*, 147 (11):1895-1906.
- Herwald H, Morgelin M, Olsen A, Rhen M, Dahlback B, Muller-Esterl W, Bjorck L. 1998. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces--a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med*, 4 (3):298-302.
- Heyman SN, Shina A, Brezis M, Rosen S. 2002. Proximal tubular injury attenuates outer medullary hypoxic damage: studies in perfused rat kidneys. *Exp Nephrol*, 10 (4):259-266.
- Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O. 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, 252 (5008):954-958.
- Holly MK, Dear JW, Hu X, Schechter AN, Gladwin MT, Hewitt SM, Yuen PS, Star RA. 2006. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int*, 70 (3):496-506.

- Hopfer U, Hopfer H, Jablonski K, Stahl RA, Wolf G. 2006. The novel WD-repeat protein Morg1 acts as a molecular scaffold for hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 3 (PHD3). *J Biol Chem*, 281 (13):8645-8655.
- Hotchkiss RD. 1948. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch Biochem*, 16 (1):131-141.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*, 271 (50):32253-32259.
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (14):7987-7992.
- Hughes J, Gobe G. 2007. Identification and quantification of apoptosis in the kidney using morphology, biochemical and molecular markers. *Nephrology (Carlton)*, 12 (5):452-458.
- Ibrahim I. 2008. It is time to label sepsis as a public health problem. *J Crit Care*, 23 (4):452-453.
- Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, Hammond R, Gimotty PA, Keith B, Simon MC. 2010. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest*, 120 (8):2699-2714.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. 2001. HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science*, 292 (5516):464-468.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. 1998. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*, 12 (2):149-162.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2001. Targeting of HIF-1alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292 (5516):468-472.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 1998. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol*, 10 (5):349-350.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20:197-216.
- Jantsch J, Wiese M, Schodel J, Castiglione K, Glasner J, Kolbe S, Mole D, Schleicher U, Eckardt KU, Hensel M, Lang R, Bogdan C, Schnare M, Willam C. 2011. Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. *J Leukoc Biol*, 90 (3):551-562.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111 (5):709-720.
- Jeong SJ, Han SH, Kim CO, Choi JY, Kim JM. 2013. Anti-vascular endothelial growth factor antibody attenuates inflammation and decreases mortality in an experimental model of severe sepsis. *Crit Care*, 17 (3):R97.
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. 1996. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O2 tension. *Am J Physiol*, 271 (4 Pt 1):C1172-1180.

- Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. 1997. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (11):5667-5672.
- Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. 1999. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 274 (10):6519-6525.
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. 1998. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J*, 17 (22):6573-6586.
- Ke Q, Costa M. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, 70 (5):1469-1480.
- Kiss J, Mollenhauer M, Walmsley SR, Kirchberg J, Radhakrishnan P, Niemietz T, Dudda J, Steinert G, Whyte MK, Carmeliet P, Mazzone M, Weitz J, Schneider M. 2012. Loss of the oxygen sensor PHD3 enhances the innate immune response to abdominal sepsis. *J Immunol*, 189 (4):1955-1965.
- Klenzack J, Himmelfarb J. 2005. Sepsis and the kidney. *Crit Care Clin*, 21 (2):211-222.
- Kobayashi H, Gilbert V, Liu Q, Kapitsinou PP, Unger TL, Rha J, Rivella S, Schlondorff D, Haase VH. 2012. Myeloid cell-derived hypoxia-inducible factor attenuates inflammation in unilateral ureteral obstruction-induced kidney injury. *J Immunol*, 188 (10):5106-5115.
- Kohan DE. 1994. Role of endothelin and tumour necrosis factor in the renal response to sepsis. *Nephrol Dial Transplant*, 9 Suppl 4:73-77.
- Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. 2004. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem*, 279 (11):9899-9904.
- Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS. 2004. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (28):10440-10445.
- Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. 1998. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*, 46 (3):327-334.
- Lahat N, Rahat MA, Kinarty A, Weiss-Cerem L, Pinchevski S, Bitterman H. 2008. Hypoxia enhances lysosomal TNF- α degradation in mouse peritoneal macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295 (1):C2-12.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. 2002. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, 295 (5556):858-861.
- Liano F, Pascual J. 1996. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int*, 50 (3):811-818.
- Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R, Taubman MB. 2002. Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol*, 80 (4):421-426.
- Linkermann A, De Zen F, Weinberg J, Kunzendorf U, Krautwald S. 2012. Programmed necrosis in acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*, 27 (9):3412-3419.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 \cdot ($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*, 25 (4):402-408.
- Lopes JA, Jorge S, Resina C, Santos C, Pereira A, Neves J, Antunes F, Prata MM. 2007. Acute renal failure in patients with sepsis. *Crit Care*, 11 (2):411.

- Lorenz W, Reimund KP, Weitzel F, Celik I, Kurnatowski M, Schneider C, Mannheim W, Heiske A, Neumann K, Sitter H, et al. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis before operation protects against lethal consequences of postoperative peritonitis. *Surgery*, 116 (5):925-934.
- Lubbers DW, Baumgartl H. 1997. Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO₂ distribution in the living tissue. *Kidney Int*, 51 (2):372-380.
- Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. 2001. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414 (6863):550-554.
- Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. 1997. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*, 386 (6623):403-407.
- Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T, Jelkmann W, Jaakkola P, Metzen E. 2004. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J*, 381 (Pt 3):761-767.
- Maxwell P. 2003. HIF-1: an oxygen response system with special relevance to the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 14 (11):2712-2722.
- Mehta RL, Bouchard J, Soroko SB, Ikizler TA, Paganini EP, Chertow GM, Himmelfarb J. 2011. Sepsis as a cause and consequence of acute kidney injury: Program to Improve Care in Acute Renal Disease. *Intensive Care Med*, 37 (2):241-248.
- Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Savage BR, Himmelfarb J, Ikizler TA, Paganini EP, Chertow GM. 2004. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney Int*, 66 (4):1613-1621.
- Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A, Acute Kidney Injury N. 2007. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*, 11 (2):R31.
- Minchenko O, Opentanova I, Caro J. 2003. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett*, 554 (3):264-270.
- Miyazaki H, Morishita J, Ueki M, Nishina K, Shiozawa S, Maekawa N. 2012. The effects of a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1 on endotoxin-induced acute kidney injury in mice. *BMC Nephrol*, 13:153.
- Miyazawa S, Watanabe H, Miyaji C, Hotta O, Abo T. 2002. Leukocyte accumulation and changes in extra-renal organs during renal ischemia reperfusion in mice. *J Lab Clin Med*, 139 (5):269-278.
- Nakayama K. 2009. Cellular signal transduction of the hypoxia response. *J Biochem*, 146 (6):757-765.
- Nangaku M, Inagi R, Miyata T, Fujita T. 2008. Hypoxia and hypoxia-inducible factor in renal disease. *Nephron Exp Nephrol*, 110 (1):e1-7.
- Neveu H, Kleinknecht D, Brivet F, Loirat P, Landais P. 1996. Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis. Results of a prospective multicentre study. The French Study Group on Acute Renal Failure. *Nephrol Dial Transplant*, 11 (2):293-299.
- Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. 2001. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J*, 15 (6):879-892.
- Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hutter J, Schramm M, Flamme I. 2002. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 296 (2):343-349.
- Opal SM, DePalo VA. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117 (4):1162-1172.

- Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, Bogatsch H, Reinhart K, Frei U, Eckardt KU, Loeffler M, John S. 2008. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock--a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol Dial Transplant*, 23 (3):904-909.
- Ortega A, Fernandez A, Arenas MI, Lopez-Luna P, Munoz-Moreno C, Arribas I, Olea N, Garcia-Bermejo L, Lucio-Cazana J, Bosch RJ. 2013. Outcome of acute renal injury in diabetic mice with experimental endotoxemia: role of hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J Diabetes Res*, 2013:254529.
- Osmon S, Warren D, Seiler SM, Shannon W, Fraser VJ, Kollef MH. 2003. The influence of infection on hospital mortality for patients requiring > 48 h of intensive care. *Chest*, 124 (3):1021-1029.
- Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Llovo J, Perez LF. 2001. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res*, 33 (2):77-79.
- Parrillo JE. 1993. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med*, 328 (20):1471-1477.
- Paxian M, Bauer I, Rensing H, Jaeschke H, Mautes AE, Kolb SA, Wolf B, Stockhausen A, Jeblick S, Bauer M. 2003. Recovery of hepatocellular ATP and "pericentral apoptosis" after hemorrhage and resuscitation. *FASEB J*, 17 (9):993-1002.
- Perkash I, Satpati P, Agarwal KC, Chakravarti RN, Chhuttani PN. 1970. Prolonged peritoneal lavage in fecal peritonitis. *Surgery*, 68 (5):842-845.
- Perrone RD, Madias NE, Levey AS. 1992. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem*, 38 (10):1933-1953.
- Peyssonnaud C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. 2007. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol*, 178 (12):7516-7519.
- Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. 1995. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*, 273 (2):117-123.
- Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, Simon MC, Keith B, Haase VH. 2007. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest*, 117 (4):1068-1077.
- Regan MC, Young LS, Geraghty J, Fitzpatrick JM. 1995. Regional renal blood flow in normal and disease states. *Urol Res*, 23 (1):1-10.
- Reinhart K, Brunkhorst FM. 2010. Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis.
- Reinhart K, Meier-Hellmann A, Beale R, Forst H, Boehm D, Willatts S, Rothe KF, Adolph M, Hoffmann JE, Boehme M, Bredle DL. 2004a. Open randomized phase II trial of an extracorporeal endotoxin adsorber in suspected Gram-negative sepsis. *Crit Care Med*, 32 (8):1662-1668.
- Reinhart K, Gluck T, Ligtenberg J, Tschaikowsky K, Bruining A, Bakker J, Opal S, Moldawer LL, Axtelle T, Turner T, Souza S, Pribble J. 2004b. CD14 receptor occupancy in severe sepsis: results of a phase I clinical trial with a recombinant chimeric CD14 monoclonal antibody (IC14). *Crit Care Med*, 32 (5):1100-1108.
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*, 13 (2):110-116.
- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*, 9 (5):517-524.
- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 8 (10):776-787.

- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*, 4 (1):31-36.
- Rosenberger C, Rosen S, Heyman SN. 2006. Renal parenchymal oxygenation and hypoxia adaptation in acute kidney injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33 (10):980-988.
- Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS, Wiesener MS, Horstrup JH, Frei U, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Bachmann S, Eckardt KU. 2002. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol*, 13 (7):1721-1732.
- Rubulotta FM, Ramsay G, Parker MM, Dellinger RP, Levy MM, Poeze M. 2009. An international survey: Public awareness and perception of sepsis. *Crit Care Med*, 37 (1):167-170.
- Ruegg CE, Gandolfi AJ, Nagle RB, Brendel K. 1987. Differential patterns of injury to the proximal tubule of renal cortical slices following in vitro exposure to mercuric chloride, potassium dichromate, or hypoxic conditions. *Toxicol Appl Pharmacol*, 90 (2):261-273.
- Russell JA, Singer J, Bernard GR, Wheeler A, Fulkerson W, Hudson L, Schein R, Summer W, Wright P, Walley KR. 2000. Changing pattern of organ dysfunction in early human sepsis is related to mortality. *Crit Care Med*, 28 (10):3405-3411.
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS. 1998. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*, 17 (11):3005-3015.
- Schley G, Klanke B, Schodel J, Forstreuter F, Shukla D, Kurtz A, Amann K, Wiesener MS, Rosen S, Eckardt KU, Maxwell PH, Willam C. 2011. Hypoxia-inducible transcription factors stabilization in the thick ascending limb protects against ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*, 22 (11):2004-2015.
- Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. 2004. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*, 114 (1):5-14.
- Seely KA, Holthoff JH, Burns ST, Wang Z, Thakali KM, Gokden N, Rhee SW, Mayeux PR. 2011. Hemodynamic changes in the kidney in a pediatric rat model of sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301 (1):F209-217.
- Semenza GL. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, 88 (4):1474-1480.
- Semenza GL. 2001. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*, 7 (8):345-350.
- Sleeman HK, Diggs JW, Hayes DK, Hamit HF. 1969. Value of antibiotics, corticosteroids, and peritoneal lavage in the treatment of experimental peritonitis. *Surgery*, 66 (6):1060-1066.
- Soilleux EJ, Turley H, Tian YM, Pugh CW, Gatter KC, Harris AL. 2005. Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. *Histopathology*, 47 (6):602-610.
- Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Hacker H, Heeg K, Wagner H. 1997. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature*, 386 (6623):336-337.
- Stahr A, Frahm C, Kretz A, Bondeva T, Witte OW, Wolf G. 2012. Morg1(+/-) heterozygous mice are protected from experimentally induced focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 1482:22-31.
- Stanka P. 1990. Zellen und Gewebe des Menschen. Basistext zur Histologie für Mediziner. Verlag Dr Brockmeyer.
- Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA. 1995. DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem*, 270 (44):26292-26302.

- Takagi H, King GL, Aiello LP. 1998. Hypoxia upregulates glucose transport activity through an adenosine-mediated increase of GLUT1 expression in retinal capillary endothelial cells. *Diabetes*, 47 (9):1480-1488.
- Takeda K, Aguila HL, Parikh NS, Li X, Lamothe K, Duan LJ, Takeda H, Lee FS, Fong GH. 2008. Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. *Blood*, 111 (6):3229-3235.
- Terra C, Guevara M, Torre A, Gilabert R, Fernandez J, Martin-Llahi M, Baccaro ME, Navasa M, Bru C, Arroyo V, Rodes J, Gines P. 2005. Renal failure in patients with cirrhosis and sepsis unrelated to spontaneous bacterial peritonitis: value of MELD score. *Gastroenterology*, 129 (6):1944-1953.
- Thiel M, Caldwell CC, Kreth S, Kuboki S, Chen P, Smith P, Ohta A, Lentsch AB, Lukashev D, Sitkovsky MV. 2007. Targeted deletion of HIF-1 α gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. *PLoS One*, 2 (9):e853.
- Thijs A, Thijs LG. 1998. Pathogenesis of renal failure in sepsis. *Kidney Int Suppl*, 66:S34-37.
- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. 1998. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev*, 12 (21):3320-3324.
- Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C. 2005. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*, 294 (7):813-818.
- van Schaik SM, Abbas AK. 2007. Role of T cells in a murine model of Escherichia coli sepsis. *Eur J Immunol*, 37 (11):3101-3110.
- Vandromme M, Gauthier-Rouviere C, Lamb N, Fernandez A. 1996. Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression. *Trends Biochem Sci*, 21 (2):59-64.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390 (6658):350-351.
- Vomastek T, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Smolkin ME, Bissonette EA, Weber MJ. 2004. Modular construction of a signaling scaffold: MORF1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (18):6981-6986.
- Wahl HG. 2003. Sepsis und Sepsismarker - Update. *J Lab Med*:431-439.
- Wan L, Bagshaw SM, Langenberg C, Sautome T, May C, Bellomo R. 2008. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? *Crit Care Med*, 36 (4 Suppl):S198-203.
- Wang GL, Semenza GL. 1993a. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (9):4304-4308.
- Wang GL, Semenza GL. 1993b. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, 268 (29):21513-21518.
- Wang GL, Semenza GL. 1996. Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression. *Curr Opin Hematol*, 3 (2):156-162.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (12):5510-5514.
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J,

- Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285 (5425):248-251.
- Wang W, Jittikanont S, Falk SA, Li P, Feng L, Gengaro PE, Poole BD, Bowler RP, Day BJ, Crapo JD, Schrier RW. 2003. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284 (3):F532-537.
- Wang Z, Herzog C, Kaushal GP, Gokden N, Mayeux PR. 2011. Actinonin, a meprin A inhibitor, protects the renal microcirculation during sepsis. *Shock*, 35 (2):141-147.
- Wang Z, Schley G, Turkoglu G, Burzlaff N, Amann KU, Willam C, Eckardt KU, Bernhardt WM. 2012. The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment. *Nephrol Dial Transplant*, 27 (3):929-936.
- Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU. 2004. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J*, 18 (12):1462-1464.
- Welford SM, Dorie MJ, Li X, Haase VH, Giaccia AJ. 2010. Renal oxygenation suppresses VHL loss-induced senescence that is caused by increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 30 (19):4595-4603.
- Wenger RH. 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*, 16 (10):1151-1162.
- Wenger RH, Gassmann M. 1997. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem*, 378 (7):609-616.
- Wenger RH, Hoogewijs D. 2010. Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298 (6):F1287-1296.
- Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. 2005. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*, 2005 (306):re12.
- Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Gassmann M, Marti HH. 1997. Hypoxia-inducible factor-1 α is regulated at the post-mRNA level. *Kidney Int*, 51 (2):560-563.
- Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. 1980. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*, 29 (2):189-201.
- Wiener CM, Booth G, Semenza GL. 1996. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 225 (2):485-488.
- Wilson JX. 2009. Mechanism of action of vitamin C in sepsis: ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *Biofactors*, 35 (1):5-13.
- Wolf G, Schroeder R, Stahl RA. 2004. Angiotensin II induces hypoxia-inducible factor-1 α in PC 12 cells through a posttranscriptional mechanism: role of AT₂ receptors. *Am J Nephrol*, 24 (4):415-421.
- Xia M, Huang R, Sun Y, Semenza GL, Aldred SF, Witt KL, Inglese J, Tice RR, Austin CP. 2009. Identification of chemical compounds that induce HIF-1 α activity. *Toxicol Sci*, 112 (1):153-163.
- Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, Dear JW, Takahashi Y, Ito S, Hu X, Zhou H, Doi K, Childs R, Klinman DM, Yuen PS, Star RA. 2008. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294 (5):F1050-1058.
- Yilmaz Savcun G, Ozkan E, Dulundu E, Topaloglu U, Sehirli AO, Tok OE, Ercan F, Sener G. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin against hepatorenal oxidative injury in an experimental sepsis model in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 19 (6):507-515.

- Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. 2001. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (17):9630-9635.
- Zapata-Morales JR, Galicia-Cruz OG, Franco M, Martinez YMF. 2014. Hypoxia-inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha) Protein Diminishes Sodium Glucose Transport 1 (SGLT1) and SGLT2 Protein Expression in Renal Epithelial Tubular Cells (LLC-PK1) under Hypoxia. *J Biol Chem*, 289 (1):346-357.
- Zhang XQ, Tian HH, Geng HM, Zhai NL, Li Z, Wang T, Lv CJ, Wang XZ. 2013. [The influence of volume load on prognosis of patients with sepsis induced acute kidney injury]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 25 (7):411-414.
- Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. 2007. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med (Berl)*, 85 (12):1339-1346.

Anhang

Geräte:

Histokinette	Leica
Paraffin-Ausguss	Leica
Paraffin-Mikrotom Leica RM 2265	Leica
poch-100iV Diff	Scil animal care company
Stoffwechselkäfig	Tecniplast
Sysmex FDC 3500i	Sysmex Deutschland GmbH
Tecan – infinite M200 mit Nano Quant plat TM	Tecan
Thermocycler	Eppendorf
Thermocycler T3000	Biometra®
Zeiss – AxioPLAN Mikroskop	Zeiss

nicht aufgeführt sind laborübliche Geräte

Software:

AxioVision	Zeiss
i-control	Eppendorf
Realplex	Eppendorf
SigmaPlot	Systat Software

nicht aufgeführt sind Software-Programme des Windows-Software-Pakets

Materialien:

Chirurgische Fäden Seide 5-0	Ethicon
LysisP Tubes (Homogenisator tubes)	AnalytikJena
21G x 1 ½“ Kanülen (0,9 x 40mm)	Braun

Kits:

Albumin-ELISA Kit (50200)	CellTrend
BD Cytometric Bead Array-Mouse	BD Biosciences
Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (560485)	Cayman Chemical Company
Creatinine (urinary) Assay Kit (500701)	Roche
In Situ Cell Death Detection Kit, POD (11 684 817 910)	Roche
Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit	Invitrogen
M-MLV reverse Transkriptase-Kit	

Mouse NGAL ELISA Kit (Kit 042)	BIOPORTO® Diagnostics
NucleoSpin	Macherey Nagel
Peroxidasereagenz ECL	
QIAamp RNA Blood Mini Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit, Qia-Shredder	Qiagen
Sysmex-Plasma/Serum Chips	Sysmex Deutschland GmbH
(Kreatinin, BUN)	
VEGF-ELISA Kit (EA-2401)	Signosis

Chemikalien:

Aprotinin 30 TIU/5 ml	Phoenix Paraceutical Inc.
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich®
Citratpuffer pH 6,1	Dako
dNTPs	Biolabs
DTT	Roth
Na-Orthovanadat	Roth
oligo dT Primer	Biolabs
RNasin (RNase-Inhibitor)	Invitrogen™
TritonX-100	Roth

nicht aufgeführt sind laborübliche Chemikalien

10x PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung; pH 7,4):

18 mM	KH ₂ PO ₄
27 mM	KCl
100 mM	Na ₂ HPO ₄
1,37 M	NaCl

CURRICULUM VITAE

seit August 2010 Promotionsstudent, CSCC, Jena mit dem Thema: „Role of HIF-1 α and MORG1 in sepsis-induced renal injury“

seit 2010 Mitglied: CSCC, CSCC-RTG

Studium der Trophologie an der FSU Jena von 2002-2008 mit dem Thema: “Role of Butyrate in tow different humane colon cancer cell lines”: Butyrate is commonly known to play a protective role in preventing of develop colon cancer. The aim of this work was the investigation the influence of butyrate in colon cancer cell lines regarding apoptosis pathways.

Posterpräsentationen mit dem Titel: „Die Rolle von MORG1 und HIF-1 α in der Sepsis induzierten Nierenschädigung“

1. Kongress für Nephrologie, Hamburg 9-10.10.2012
2. Jahrestagung Thüringer Internisten, Jena 23.-24.11.2012
3. Sepsis-Kongress, Weimar 3.-6.9.2013

geplante Publikationen:

1. Schindler, K., Schindler, C., Claus, R., Bondeva, T., Wolf, G.: Influence of prolyl-hydroxylases-inhibition in sepsis-induced renal injury.
2. Schindler, C., Schindler, K., Claus, R., Bondeva, T., Wolf, G.: Role of HIF-1 α and MORG1 in sepsis-induced renal injury.

Danksagung

Diese Widmung gilt all jenen, die mich auf dem Weg begleitet, gestützt und unterstützt haben sowie die, die mir dienlich oder behilflich waren.

Herrn Prof. Dr. med. G. Wolf, MHBA danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen, als Ernährungswissenschaftlerin ein medizinisch relevantes Thema in der Klinik III des Universitätsklinikums Jena bearbeiten zu dürfen. Weiterhin habe ich ihm für seine Unterstützung und Anstöße sowie Bereitstellung von Ressourcen zu danken.

Dem integrierten Forschungs- und Behandlungszentrum „Sepsis und Sepsisfolgen“ (CSCC), Jena bin ich sehr verbunden in Bezug auf die wissenschaftliche Förderung. Des Weiteren gab mir die Research Training Group des CSCC die Möglichkeit in vielen verschiedenen Praktika mein Wissen zu erweitern.

Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), FKZ: 01EO1002, gefördert.

Zu Dank verpflichtet bin ich Frau Dr. Bondeva, meiner direkten Betreuerin im Labor. Sie half mir in jeglicher Sache mit konstruktiven Gesprächen und unterstützte mich in allen Fragen.

Katrin Schindler schätze ich sehr, da sie mich in der Durchführung von Tierexperimenten unterstützt hat und immer ein „offenes Ohr“ für mich hatte.

Der Arbeitsgruppe „Nephrologie/Rheumatologie“ der KIM III im Forschungszentrum Lobeda bin ich für die unterstützende Zusammenarbeit sehr dankbar.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Mann, Hagen, meinen Kindern, Julius und Lilou sowie meiner Familie für den Beistand, die Motivation und die Geduld, die mir entgegengebracht wurde, bedanken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und von mir benutzte Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Analyse des Materials (Wildtyp-Mäuse): K. Schindler (Doktorandin), S. Klose–Wenig (MTA) sowie bei der Herstellung der Dissertation unterstützt haben: Prof. Dr. med. G. Wolf, MHBA und Dr.rer.nat. T. Bondeva,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers